Tome 48 — N° 5-6 — Mai-Juin 1951
Revue mensuelle

JOURNAL DE CHIMIE PHYSIQUE ET DE PHYSICO-CHIMIE BIOLOGIQUE

SOMMAIRE

PUBLICATION DE LA
SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE
Direction, Administration
École nationale supérieure de Chimie, 11, rue Pierre-Curie, Paris
Revue publiée avec le concours du Centre National de la Recherche Scientifique

JOURNAL DE CHIMIE PHYSIQUE

PRIX DE L'ABONNEMENT 1951
(Frais d'envoi compris)

France .... 3 000 francs
Étranger .... 3 500 francs

Pour les membres de la Société de Chimie Physique :
(Cotisation et frais d'envoi compris)

France .... 2 000 francs
Étranger .... 2 500 francs

Librairies :

Les abonnements pris par les librairies ne sont acceptés qu'aux prix de Frs : 3 000 pour la France et Frs : 3 500 pour l'Étranger.

Rédaction :

M. G. KERSAINT, École Normale Supérieure, 45, rue d'Ulm, Paris, 5e. Tél. : ODÉ. 81-95.

Règlements :

A l'ordre du Trésorier de la Société de Chimie Physique, École nationale supérieure de Chimie, 11, rue Pierre-Curie, Paris, 5e. Compte chèques postaux, Paris, N° 61-31.

SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE

(Fondée en 1908)

Admission. — Pour être membre de la Société, il suffit d'être présenté par deux membres. L'élection a lieu dans la séance qui suit celle de la présentation.

Cotisation. — La cotisation annuelle est fixée à 1 000 francs. Elle donne droit à la réception des procès-verbaux des séances.

Les cotisations doivent être adressées au Trésorier de la Société de Chimie physique.
École nationale supérieure de Chimie, 11, rue Pierre-Curie, Paris, 5e

Compte chèques postaux 61-31.

Agent exclusif pour les U. S. A. & le Canada :

STECHERT-HAFNER Inc., 31 East 10th Street, NEW-YORK 3. N. Y.

LE CENTRE DE DOCUMENTATION DU C. N. R. S.

18, rue Pierre-Curie, PARIS (Ve)

Odéon 10-01 C. C. Postal PARIS 9131-62

publie mensuellement un « BULLETIN ANALYTIQUE » où sont signalés, par de courts extraits classés par matières, tous les travaux scientifiques, techniques et philosophiques publiés dans le monde entier.

Cette revue bibliographique mensuelle, l'une des plus importantes du monde puisqu'elle a signalé, en 1950, environ 86.000 articles et mémoires, est scindée en trois parties :

— la première, consacrée aux sciences physico-chimiques ;

— la seconde, consacrée aux sciences biologiques ;

— la troisième, consacrée à la philosophie (cette dernière partie paraît trimestriellement).

Des TIRÉS A PART sont mis à la disposition des spécialistes.

Le CENTRE DE DOCUMENTATION du C. N. R. S. fournit, en outre, la reproduction photographique sur MICROFILM ou sur PAPIER des articles signalés dans le « BULLETIN ANALYTIQUE » ou des articles dont la référence bibliographique précise lui est fournie, ainsi que la version française des articles en langues étrangères.

TARIFS D'ABONNEMENT AU BULLETIN ANALYTIQUE (Parties complètes)

	France	Etranger
1re partie	4.000 frs	5.000 frs
2e partie	4.000 frs	5.000 frs
3e partie	1.500 frs	2.000 frs

Une réduction de 50 % est accordée sur les tarifs d'abonnement aux parties complètes du Bulletin Analytique **au personnel du C. N. R. S.**

TARIFS D'ABONNEMENT AU BULLETIN ANALYTIQUE (Tirés à part)

	France	Etranger
MATHÉMATIQUES PURES ET APPLIQUÉES — MÉCANIQUE — PHYSIQUE MATHÉMATIQUE	700 frs	900 frs
ASTRONOMIE — ASTROPHYSIQUE — PHYSIQUE DU GLOBE	900 frs	1.100 frs
GÉNÉRALITÉS SUR LA PHYSIQUE—ACOUSTIQUE—THERMODYNAMIQUE—CHALEUR — OPTIQUE — ÉLECTRICITÉ ET MAGNÉTISME	1.200 frs	1.400 frs
PHYSIQUE CORPUSCULAIRE — STRUCTURE DE LA MATIÈRE	600 frs	800 frs
CHIMIE GÉNÉRALE — CHIMIE PHYSIQUE	600 frs	800 frs
CHIMIE MINÉRALE — CHIMIE ORGANIQUE — CHIMIE APPLIQUÉE — MÉTALLURGIE	2.200 frs	2.500 frs
SCIENCES DE L'INGÉNIEUR	1.500 frs	1.700 frs
MINÉRALOGIE — PÉTROGRAPHIE — GÉOLOGIE — PALÉONTOLOGIE	700 frs	900 frs
BIOCHIMIE — BIOPHYSIQUE — SCIENCES PHARMACOLOGIQUES — TOXICOLOGIE	1.200 frs	1.400 frs
MICROBIOLOGIE — VIRUS ET BACTÉRIOPHAGES — IMMUNOLOGIE	800 frs	900 frs
BIOLOGIE ANIMALE — GÉNÉTIQUE — BIOLOGIE VÉGÉTALE	2.200 frs	2.500 frs
AGRICULTURE — ALIMENTS ET INDUSTRIES ALIMENTAIRES	700 frs	900 frs

NOTA. — *Une réduction de 25 % sur les tarifs indiqués ci-dessus est accordée* **au personnel du C. N. R. S. et aux membres des Sociétés Savantes.**

TARIFS DES REPRODUCTIONS PHOTOGRAPHIQUES

La bande de 10 pages de MICROFILM NÉGATIF : 75 frs

AGRANDISSEMENTS

6 × 9	34 frs	9 × 12	40 frs	13 × 18 et 15 × 21	52 frs
18 × 24	63 frs	21 × 27	106 frs		

Une réduction sur ces tarifs est accordée **au personnel du C. N. R. S.**

De plus, un droit de recherches forfaitaire d'un montant de **100 francs** *est facturé pour les reproductions photographiques d'articles non extraits du Bulletin Analytique.*

COMPTES RENDUS DE LA SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE

Séance du 10 janvier 1951

Michel Soutif. — **Étude des structures cristallines au moyen de la résonance paramagnétique nucléaire.**

Introduction. — Certains noyaux possèdent un moment cinétique de rotation sur eux-mêmes, $\vec{a}$. Celui-ci s'accompagne d'un moment magnétique $\vec{\mu}$ qui crée un paramagnétisme nucléaire très petit vis-à-vis du diamagnétisme sous-jacent. Seules des méthodes de résonance permettent de mettre en évidence ce magnétisme nucléaire (1). Trois grandeurs caractéristiques doivent être introduites :

a) La fréquence de résonance dans un champ magnétisant H_0, soit $\omega = \frac{\mu}{a} \cdot H_0 = \gamma H_0$. Cette fréquence est pratiquement une constante de l'élément envisagé.

b) L'amortissement de l'aimantation statique caractérisé par une constante de temps T_1, temps de relaxation spin-milieu.

c) L'amortissement de la résonance mesuré par T_2, temps de relaxation spin-spin.

Calcul du temps de relaxation T_2. — La théorie quantique permet de montrer que l'amortissement de la résonance crée un élargissement de la raie, calculé par Van Vleck (2). Le second moment de la raie d'un solide sans mouvements internes est :

$$\Delta H_2^2 = \frac{3}{2}\gamma^2\hbar^2\frac{i(i+1)}{N}(1 - \cos^2\theta_{ij})^2 r_{ij}^{-6}$$

où r_{ij} et θ_{ij} sont les vecteurs liant les noyaux résonants et les orientations de ces vecteurs par rapport au champ magnétisant H_0. Une étude expérimentale de ΔH_2^2 (obtenu par photographie de courbes de résonance sur un écran d'oscilloscope) permet de déterminer les quantités r_{ij} et θ_{ij} et d'étudier ainsi des structures cristallines.

Études de points de transition. — Les points λ, apparaissant dans l'étude des propriétés physiques de certains cristaux en fonction de la température, se manifestent par une discontinuité du second moment. Nous avons construit (3) un cryostat permettant d'opérer entre la température du point triple de l'azote et la température ordinaire et étudié aussi les transitions de FNH_4, $ClNH_4$ et $PO_4H_2NH_4$.

Étude de changements de structure. — Nous étudions la résonance de divers échantillons de caoutchouc en fonction de la tension.

Étude de structures. — Les monocristaux de benzène fabriqués à l'E. N. S. par A. Fruhling ont été étudiés au voisinage de 0° en faisant tourner le cristal par rapport au champ H_0. Une forte anisotropie se manifeste : elle permet de vérifier la structure proposée par Cox (3) et de calculer la distance C—C dans un cycle benzénique.

Étude de mouvements cristallins. — La formule de Van Vleck doit être modifiée pour tenir compte des mouvements ioniques : le résultat dépend de l'hypothèse faite sur ces mouvements et permet par suite de choisir entre diverses possibilités.

Nous avons étudié le $ClNH_4$ de part et d'autre du point λ. Les hypothèses proposées à ce sujet peuvent se ramener à trois :

a) Hypothèse de Pauling : à partir de t apparaît une rotation isotrope de l'ion NH_4 autour de N.

b) Hypothèse de Menzies reprise par Wagner et Hornig (5) : apparition de positions symétriques et antisymétriques du tétraèdre NH_4 au-dessus de t_λ.

c) Apparition d'une rotation ternaire autour d'un axe N-H (Bauer).

L'étude systématique (3) d'une poudre polycristalline et d'un monocristal à — 210° puis à la température ordinaire vérifie très bien l'hypothèse *c* à l'exclusion des deux autres.

Une étude indépendante de l'anisotropie du paramagnétisme nucléaire d'un monocristal à la température ordinaire (6) confirme ce résultat.

BIBLIOGRAPHIE

(1) M. Soutif. — *Journal de Physique*, 1949, X, p. 61D.
(2) J. Van Vleck. — *Phys. Rev.*, 1948, **73**, p. 679.
(3) M. Soutif. — Thèse, Paris, 1950.
(4) Cox. — *Proc. of Roy. Soc.*, 1932, A **135**, p. 491.
(5) Wagner et Hornig. — *Journ. of Chem. Phys.*, 1950, **18**, p. 296.
(6) Ayant et Soutif. — *C. R. Académie des Sciences*, en cours de parution.

Séance du 24 janvier 1951

Alfred Gillet. — **Considérations sur l'électrolyse des composés organiques.**

Kolbe a découvert, il y a cent ans, une des réactions les plus intéressantes de l'électrochimie et de la chimie organique ; cette réaction attend toujours une explication définitive, malgré le monument scientifique que lui a élevé F. Fichter de Bâle. On sait, depuis les expériences de Jolibois en 1912, que l'on peut faire l'électrolyse des organomagnésiens de Grignard en solution dans l'éther anhydre. Plusieurs auteurs (dont Ward V. Evans, à Chicago) ont fait depuis des recherches intéressantes sur les produits que l'on recueille lors de ces électrolyses. L'étude expérimentale des mécanismes des réactions d'électrode lors de ces électrolyses est aujourd'hui pleine d'intérêt et riche en problèmes non encore résolus. L'emploi de techniques nouvelles semble ouvrir ici une voie vers la réponse à des questions importantes, notamment celles des stabilités et des rôles respectifs, en solution, du radical libre RCH_2 et des ions organiques RCH_2 + et RCH_2 —.

Séance du 14 février 1951

Y. Rocard. — **Théorie moléculaire de la capillarité.**

Si l'on cherche, par la théorie cinétique des gaz, l'expression

de la force qui agit sur les molécules de l'unité de volume d'un fluide, en supposant la densité non uniforme, on ne trouve pas $\frac{\partial T}{x}$ mais bien $X = \frac{\partial P}{\partial x} - \frac{\alpha\sigma^2\lambda}{5M^2}\rho\frac{\partial\Delta\rho}{\partial x}$ σ étant le diamètre moléculaire, M la masse moléculaire, a la constante bien connue de l'équation de VAN DER WAALS, et ρ la densité. λ est un nombre pur dépendant de la loi de force intermoléculaire choisie ; λ vaudrait 3 pour des forces de LONDON en $1/r^7$.

Sur cette base on peut développer une théorie complète de la tension superficielle d'un corps en présence de sa vapeur, laquelle a été publiée par nous il y a fort longtemps [*Journal de Physique*, **4**, 1933, p. 533] ce qui nous dispense de la reproduire ici. Nous mentionnerons seulement quelques nouveaux développements.

1. **On peut tenir compte de la pesanteur.** — L'effet n'est important qu'au point critique, où le liquide, infiniment compressible, est très sensible à son propre poids. On trouve que l'état critique n'est réalisé que dans une tranche ($z = 0$) et que la loi de la densité en fonction de la hauteur est :

$$\frac{\rho - \rho_c}{\rho_c} = \frac{5}{18}\left(\frac{\rho_c\sigma g}{P_c}\right)\left(\frac{z}{\sigma}\right)^3$$

5/18 venant de l'emploi de l'équation de VAN DER WAALS, g étant l'accélération de la pesanteur. Si l'on fait $z/\sigma = 10^4$, on trouve $\rho = 1{,}03\ \rho_c$ par exemple, avec pour ρ_c et P_c des valeurs normales. Comme σ est de l'ordre de 10^{-8} on voit que la densité critique est très peu réalisée en somme.

M. YVON, qui a travaillé postérieurement à notre article de 1933, a de son côté publié depuis longtemps sur ce point des remarques analogues, et les a utilisées à empêcher la diffusion de la lumière au point critique de devenir infinie. De mon côté, en 1933 également, j'ai montré que la prise en considération des forces complémentaires en $\frac{\partial\Delta\rho}{\partial x}$ suffisait à obtenir la modification voulue à la théorie de l'opalescence critique, même sans appel à la pesanteur.

2. — Depuis ce travail de 1933 j'ai développé des calculs numériques utilisant l'équation d'état donnée dans deux notes aux C. R., 1949, **229**, p. 987 et 1061. Ces calculs aboutissent à de très bonnes vérifications de la loi de force de London quand on calcule la tension superficielle par la théorie en question.

3. — Il est possible de développer une théorie de l'adsorption (bien incomplète sans doute, disons : d'un mode physique d'adsorption) sur ces bases : on tient compte simplement des forces de LONDON entre une molécule du fluide et les atomes accumulés dans le solide voisin. Cette théorie montre immédiatement que ce sont les pointes qui adsorbent et pas les trous. Elle trouve aussi un effet beaucoup plus important au-dessous de la température critique qu'au-dessus, parce qu'au-dessous le solide peut provoquer une véritable *liquéfaction* sur sa surface, bien que la pression d'équilibre du liquide homogène ne soit pas obtenue.

M. EMSCHWILLER a rappelé au cours de la discussion qu'il avait suggéré en 1936 (en se basant surtout sur l'exemple de la photosynthèse des glucides) qu'il pourrait exister une relation entre la réactivité des gaz adsorbés et leur température critique, et fait remarquer que cette diminution d'activité pourrait se rattacher à l'effet signalé qui recevrait ainsi une illustration expérimentale.

M. DUBRISAY a cité des travaux expérimentaux de REBOUL mettant bien en évidence le fait que ce sont effectivement les parties convexes et non concaves des solides qui adsorbent le plus (à une échelle très petite bien entendu).

Peut-être sera-t-il intéressant de rappeler malgré tout la formule fondamentale obtenue en 1933 pour la tension superficielle τ_i :

$$\tau_i = \sqrt{\frac{2}{5}\frac{a\sigma^2\lambda}{M^2}}\int_{\rho_1}^{\rho_2}\left[\sqrt{\rho\int_{\rho_1}^{\rho}\frac{P(\rho) - P(\rho_1)}{\rho^e}d\rho}\right]\cdot d\rho$$

ρ_1 densité du gaz, ρ_2 densité du liquide, $P(T, \rho)$ équation d'état *théorique* prévoyant notamment tous les états intermédiaires entre le liquide et la vapeur. λ a la signification déjà donnée. On fait cependant remarquer que la signification de λ peut varier quelque peu si on lui fait absorber quelques imperfections et approximations de calcul concernant la probabilité de distance de deux molécules données.

Séance du 28 février 1951

M[lle] S. TRAUTMANN. — **Électrostriction et ultrafiltration(communication présentée par M. le D[r] L. Ambard).**

Lorsque l'on filtre sur une membrane de cellophane des solutions 2 M/1000 de sulfate de potassium, chlorure de potassium, chlorure de calcium, on constate que ces sels sont retenus audessus du filtre, dans des proportions qui sont respectivement de 85, 30 et 1 %. De pareilles différences ne sauraient s'expliquer par des différences de tailles des ions et l'on est naturellement amené à les attribuer à l'inégale hydratation des ions, sur laquelle nous renseigne l'électrostriction des solutions salines. Si l'on tient compte de ce que les ions divalents sont plus hydratés que les ions monovalents et si l'on admet que, dans nos expériences, c'est l'anion qui se présente en premier à la membrane filtrante, les résultats expérimentaux précités s'expliquent dans une certaine mesure. Mais l'explication est plus complète si l'on tient compte de l'action réciproque des ions quant à leurs hydratations respectives. Des expériences d'ultrafiltration d'un type particulier mettent nettement ce phénomène en évidence et en montrent la grande ampleur. En résumé, l'électrostriction nous éclaire sur les faits d'ultrafiltration et réciproquement l'ultrafiltration nous éclaire sur les faits d'électrostriction.

Séance du 14 mars 1951

P. CLÉMENT et R. THIÉBAUT. — **Évaluation de la polymolécularité d'un haut polymère par fractionnement simplifié.**

Les caractéristiques moléculaires des substances polymérisées ont une importance fondamentale, car elles conditionnent une grande partie de leurs propriétés : aspect morphologique, point de fusion, propriétés mécaniques, solubilité, propriétés rhéologiques, osmotiques et optiques des solutions, etc..

Dans un grand nombre de cas, il est indispensable de savoir évaluer rapidement ces caractéristiques (valeur de la masse moléculaire et polymolécularité).

Une première méthode pour évaluer l'hétérogénéité monomoléculaire consiste à mesurer, par une technique appropriée, les valeurs *moyennes* des masses moléculaires (moyennes numériques, pondérales, viscosimétriques, etc.) et à les comparer, en déterminant, par exemple, un écart type en fonction de deux de ces valeurs moyennes.

La connaissance de la courbe de répartition donne des renseignements plus concrets sur la polymolécularité, mais le tracé par points de cette courbe exige généralement une séparation du polymère en un grand nombre de fractions qu'il faut purifier pour les rendre isomoléculaires.

Cette opération de fractionnement peut cependant être évitée s'il est possible de séparer le polymère en une série de deux portions non homogènes contenant des molécules de masses moléculaires supérieures et inférieures à une limite M_s. Le calcul montre, en effet, que la seule connaissance des poids S de différentes portions contenant les molécules les plus lourdes, et la connaissance de la masse moléculaire moyenne $\overline{M}_s$ de cette portion, permet de tracer directement la courbe de répartition du polymère.

Ce fractionnement binaire peut être effectué par un moyen quelconque (dissolution, précipitation, etc.) et les masses moléculaires peuvent être mesurées par des méthodes permettant d'atteindre les moyennes numériques pondérales ou viscosimétriques.

1. Moyenne numérique. — Le calcul montre que la courbe intégrale pondérale de répartition peut être tracée par simple dérivation de la courbe correspondant à la variation du rapport $\frac{S}{\overline{M}_{s_n}}$ en fonction des poids S.

2. Moyenne pondérale ou viscosimétrique. — La courbe de répartition pondérale est déduite par dérivation de la courbe traduisant la variation du produit $S \cdot \overline{M}_{s_p}$ en fonction des points S. La courbe intégrale en fonction des viscosités intrinsèques peut être tracée en mesurant les produits $S \cdot \overline{M}_{s_v}$.

Dans chacun de ces cas, la courbe de répartition numérique peut être enfin calculée à partir de l'intégrale pondérale par les procédés classiques.

Cette technique simple a été appliquée à l'évaluation rapide de la polymolécularité des deux triacétates de cellulose pour lesquels les différentes caractéristiques moléculaires ont pu être comparées et précisées (allure des courbes de répartition, masses moyennes, masses les plus probables).

Séance du 11 avril 1951

Mme J. Michel. — **« Potentiels de surface » de films gazeux d'acide myristique et de stéarylamine.**

On rappelle les résultats exposés antérieurement [1] relatifs aux potentiels de surface de *films gazeux d'acide myristique* étalés sur l'eau distillée et diverses solutions d'HCl. Les mesures étaient faites à l'aide d'un appareil à électrode ionisante au polonium et à lampes électromètres. L'ensemble des résultats (potentiels V en fonction des densités superficielles δ) est représenté par une gerbe de courbes dont chacune correspond bien (aux grandes dilutions) à la relation $V = 4\pi m (\delta - K\delta^3/^2)$. La tangente à l'origine ($V = 4\pi m\delta$), commune à toutes les courbes, conduit à des valeurs du moment vertical apparent, de l'ordre de $1{,}7 . 10^{-18}$ c.g.s. ; les courbes s'écartent de cette tangente d'autant plus vite que le support est plus acide. Le sens du dipôle est $\mp$.

Par la suite, la technique a été améliorée. Au lieu de faire les mesures par points correspondant à des étalements distincts, on a utilisé pour obtenir rapidement une série de films gazeux de densités superficielles connues et croissantes une seringue superficielle (antérieurement utilisée pour les mesures de pressions) [2]. Les mesures de potentiel correspondant à deux points consécutifs sont faites à intervalles réguliers. Le potentiel de l'eau est repéré avant et après la série ; on a parfois à apporter une légère correction, du fait de la dérive de l'appareil de mesure.

Après confirmation d'anciens résultats, on a étudié les films gazeux d'acide myristique sur des solutions de SO_4H_2. On obtient une gerbe de courbes moins ouverte que sur les solutions d'HCl (à pH égal la courbe s'écarte moins de la tangente à l'origine). Ce fait est peut-être à rapprocher de la tensioactivité négative de l'acide sulfurique.

L'étude des films de stéarylamine (légèrement solubles dans un domaine étendu de pH) a nécessité une technique particulière. On établit d'abord au micromanomètre à fil tendu [3] la courbe pression-densités (p-δ), par points, chaque point étant obtenu par extrapolation au temps d'étalement, en appliquant une relation due à L. Saraga : $p = p_0 - a\sqrt{t}$.

Après contrôle de validité (masse moléculaire correcte), on mesure simultanément potentiel de surface et pression superficielle d'une série de films gazeux, 1 ou 2 minutes après étalement (évaporation du solvant). Puis, en utilisant les déterminations préalables pressions-densités, on fait correspondre un potentiel à une densité superficielle donnée. Le potentiel du film gazeux est du même signe que celui des films très dilués d'acide myristique si la stéarylamine est étalée sur des supports nettement alcalins. Le potentiel s'annule vers pH 9,7 et reste de signe opposé pour les pH inférieurs. Au pH d'annulation du potentiel correspond un état gazeux extrêmement réduit et une pression de condensation particulièrement faible (environ 4 millidynes/cm).

BIBLIOGRAPHIE

(1) J. Michel et J. Guastalla. — *J. Ch. Phys.*, **47**, 1950, p. 379.
(2) J. Guastalla. — *Cah. de Phys.*, **10**, 1942, p. 36.
(3) J. Guastalla. — *C. R. Ac. Sc.*, **206**, 1938, p. 993.

Mme L. Guastalla. — **Adsorption sur la paraffine de quelques acides gras à partir de solutions aqueuses ou par prélèvement de films.**

Plongeons verticalement une lame paraffinée dans l'eau pure, puis dans une solution d'un corps adsorbable sur la paraffine, en mesurant la force verticale f exercée (de haut en bas) sur la lame. Comme on l'a exposé antérieurement [1], quand f devient constant, le travail de mouillage, changé de signe (ou tension d'adhésion d'entrée) est mesuré par f/ϖ (ϖ étant le périmètre de la lame). Soit τ_0 la tension d'adhésion paraffine-eau pure, τ_{sol} la tension d'adhésion (mesurée à l'équilibre) paraffine-solution. La différence $\Delta\tau = \tau_{sol} - \tau_0$ peut être pratiquement considérée comme le travail d'adsorption du corps en solution sur la paraffine ; on appellera cette différence (avec Harkins) [2] pression interfaciale (p_i) du film adsorbé sur la lame, par analogie avec la pression superficielle p du film adsorbé à la surface libre, qui correspond pratiquement au travail d'adsorption ($p = \gamma_0 - \gamma_{sol}$, γ étant la tension superficielle).

On utilise ici des lames paraffinées très lisses, à faible hystérésis de mouillage, permettant de déterminer p_i à peu près indifféremment soit à l'entrée de la lame dans le liquide, soit à sa sortie ($\Delta\tau_{entrée} \backsimeq \Delta\tau_{sortie}$).

Pour des solutions (dans HCl N/100) de divers acides gras à chaîne saturée, on mesure simultanément p_i et p en fonction des concentrations molaires C. Les courbes des p_i et des p ont des formes analogues et sont très voisines pour les acides légers. Les différences $p_i - p$ (positives) s'accentuent avec la longueur de la chaîne. La courbe des p dénote à partir de l'acide C_7 une tendance à un changement d'état superficiel [3], changement bien caractérisé pour C_{12} ; or, pour tous ces corps, les courbes des p_i ne dénotent aucune tendance à un changement d'état dans le film adsorbé sur la paraffine.

Pour l'acide laurique, $p_i - p$ est de l'ordre de 5 dynes/cm dans un vaste domaine de concentrations [4].

Pour l'acide myristique, pratiquement insoluble, on étudie le *mouillage par prélèvement de film*, de densité *superficielle* δ

connue ; mais la densité δ_i du film prélevé sur la lame à sa plongée est inconnue *a priori*. La grandeur commune aux mesures simultanées de p et de p_i est la concentration C d'une tranche très fine de solution supposée en équilibre de Gibbs avec les deux films considérés comme des films d'adsorption [5]. On détermine C (à un facteur constant près) par application de la relation de Gibbs à l'isotherme p — σ (σ, aire moléculaire) :

$$\delta = \frac{1}{\sigma} = \frac{1}{kT}\frac{dp}{dL_nC};$$

$$kTL_n(C/A) = \int \sigma dp ;$$

d'où tracé des courbes représentant p_i et p en fonction de C/A. Il semble qu'apparaisse ici une tendance à un changement d'état dans le film adsorbé sur le solide.

(1) Cf. J. et L. Guastalla. — *C. R. Ac. Sc.*, **226**, 1948, p. 2054 ; et *J. Ch. Phys.*, **46**, 1949, p. 150.

(2) Cf. Harkins et Fowkes. — *J. A. C. S.*, **52**, 1940, p. 3377 ; et J. Guastalla, L. Guastalla, D. Luzzati, H. L. Rosano, L. Saraga. — *C. R. Ac. Sc.*, **231**, 1950, p. 220. Harkins détermine indirectement τ par des mesures d'angle de raccordement et de tension superficielle.

(3) Les particularités relatives aux tensions *superficielles* des solutions d'acides gras sont connues depuis longtemps et ne sont rappelées ici que pour permettre la comparaison avec l'adsorption sur la paraffine. Cf. en particulier Szyszkowski (*Z. Phys. Ch.*, **64**, 1908, p. 385) pour les acides légers, Frumkin (*Z. Phys. Ch.*, **116**, 1925, p. 466) pour les acides à chaîne plus longue.

(4) On comparera ces résultats à ceux de Harkins (*loc. cit.*) (adsorption de divers corps à chaîne courte sur des solides) ; et à ceux de Hutchinson (*J. Coll. Sc.*, **3**, 1948, p. 235) (films adsorbés à des interfaces entre deux liquides).

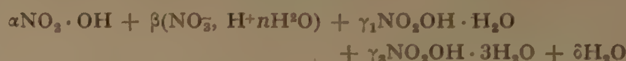
(5) L. Saraga a montré qu'un film *étalé* d'acide laurique ou myristique était en équilibre avec une couche très mince de solution (*C. R. Ac. Sc.*, **231**, 1950, p. 46, et **231**, 1950, p. 335 ; *J. Ch. Phys.*, **47**, 1950, p. 380).

Séance du 25 avril 1951

Jean Chédin. — **Essai d'une description quantitative des mélanges d'acide nitrique et d'eau : hydrates, équations d'équilibre, ionisation.**

En partant de données spectrales, thermo-chimiques et des mesures de tension de vapeur, concernant les mélanges d'acide nitrique et d'eau, on montre que les mélanges contiennent essentiellement les espèces chimiques suivantes :

$NO_2.OH$, les 2 hydrates $NO_2OH.H_2O$ et $NO_2OH.3H_2O$, les ions NO_3^-, H^+ solvatés, et enfin des molécules H_2O. On donne les chaleurs approximatives de formation des hydrates. Le coefficient d'ionisation des mélanges aux différentes concentrations a été déterminé antérieurement par plusieurs auteurs, avec un bon accord. On étudie les équilibres de formation des hydrates et l'on propose une description quantitative approchée des mélanges aux différentes concentrations :



$$\alpha NO_2 \cdot OH + \beta(NO_3^-, H^+ nH^2O) + \gamma_1 NO_2OH \cdot H_2O + \gamma_3 NO_2OH \cdot 3H_2O + \delta H_2O$$

c'est-à-dire que l'on donne les valeurs de α, β, γ_1, γ_3, δ aux différentes concentrations.

Les spectres d'absorption dans l'ultra-violet confirment les résultats obtenus. On détermine les courbes d'absorption dans l'U. V. des différentes particules absorbantes, complétant ainsi le travail de R. Dalmon. On confirme enfin l'existence d'un demi-hydrate $2NO_2OH.H_2O$, dans les mélanges les plus concentrés.

L'INTERACTION ENTRE LES COLORANTS ET LES PROTÉINES

par Gerald OSTER

Manuscrit reçu le 17-4-51

SOMMAIRE

Le spectre d'absorption des fluorescéines : uranine, éosine, érythrosine, et rose bengale est modifié en présence de petites quantités de sérumalbumine. Cette altération permet de déterminer la liaison relative de ces colorants à la protéine. L'altération du spectre décroît avec le pH au voisinage de pH 9. Par des expériences de dialyse l'énergie libre de liaison du colorant à la sérumalbumine est déterminée.

Les protéines natives : ovalbumine, chymotrypsine, virus de la mosaïque de tabac ne modifient pas le spectre des colorants, la lactoglobuline ne montre cet effet que légèrement. Cependant si on dénature par la chaleur ces protéines, elles provoquent alors une altération marquée du spectre. L'ovalbumine dénaturée perd progressivement son effet sur les colorants en présence de chymotrypsine native.

Introduction. — On sait que plusieurs anions peuvent être liés à la sérum-albumine, même aux valeurs de pH où la protéine possède une charge négative nette ([1]), ([2]), ([3]). Cet effet qui semble être particulier à l'albumine du sérum indique que cette protéine joue un rôle particulier dans la circulation du sang en ce qui concerne le transport de certains médicaments ([1]). Les autres protéines ne présentent cet effet qu'à l'état dénaturé ([1]).

Dans ce travail nous allons étudier l'interaction entre certains colorants anioniques apparentés à la fluorescéine et diverses protéines dans des conditions variées ; nous pourrons ainsi élucider certains points du mécanisme de ce genre d'interaction.

Résultats expérimentaux. — Les quatre colorants étudiés sont : 1° l'uranine (sel disodique de la fluorescéine) ; 2° l'éosine (sel disodique de la tétrabromo fluorescéine) ; 3° l'érythrosine (sel disodique de la tétraiodo tétrachloro fluorescéine). Ces substances sont des indicateurs de pH dans la région de pH 6. Elles ne suivent pas la loi de Beer-Lambert aux concentrations avec lesquelles nous avons travaillé (environ 10^{-5}M). La figure 1*a* montre le spectre d'absorption du rose bengale à la concentration $1{,}8.10^{-5}$ M, obtenue à l'aide du spectrophotomètre Beckman. Aux concentrations plus élevées le maximum d'absorption à 545 $m\mu$ est diminué et la bosse se trouvant aux environs de 500 $m\mu$ devient plus prononcée. Quand on porte à l'ébullition la solution de rose bengale, ou bien quand on ajoute de l'acétone le maximum reste 545 $m\mu$ et la bosse disparaît. Ces changements sont accompagnés, particulièrement dans le cas de l'érythrosine, d'une augmentation de la fluorescence obtenue par irradiation avec une lampe de Wood.

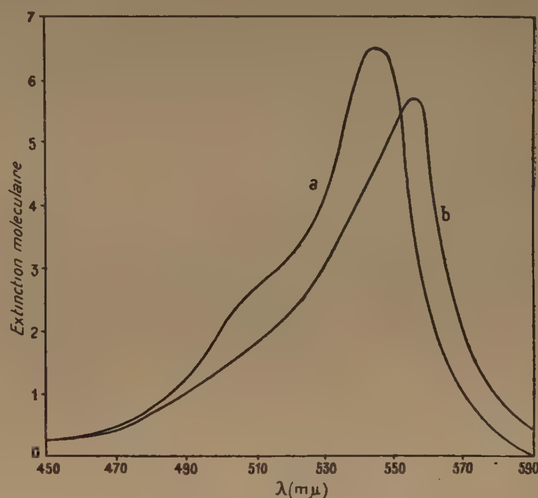


Fig. 1.

Après addition de sérumalbumine le changement du spectre est beaucoup plus prononcé et on peut voir que la couleur devient plus foncée. Sur la figure 1*b* on voit le spectre d'absorption de rose bengale additionné de 0,6 mg/cc de sérumalbumine bovine (Armour laboratories). On constate que le maximum d'absorption est déplacé à 555 mμ. Dans le cas de l'érythrosine l'addition de sérumalbumine provoque un changement du spectre de fluorescence qui de jaune verdâtre passe au rouge foncé. Les quatre colorants montrent des déplacements analogues du spectre d'absorption.

La figure 2 montre la courbe de variation de la densité optique du rose bengale à trois concentrations différentes, en fonction de la concentration en sérumalbumine. La longueur d'onde de 570 $m\mu$ a été choisie

car dans cette région les différences du spectre sont les plus marquées. Pour chaque concentration du colorant les courbes montrent un plateau. Le nombre

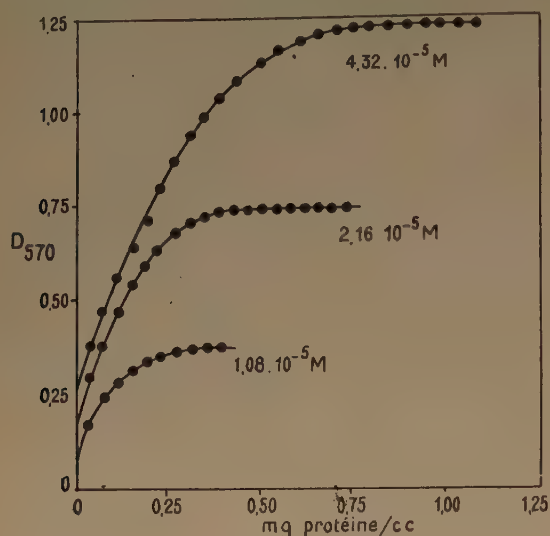


Fig. 2.

des molécules de colorant pour une molécule de protéine (poids moléculaire 70.000) au début de l'établissement de ce plateau est une constante (tableau I) qui ne dépend pas de la concentration du rose bengale.

TABLEAU I

Colorant	Longueur d'onde du maximum en présence d'un excès de protéines	Longueur d'onde choisie pour les observations	Nombre de molécules de colorants par molécule de protéine
Uranine........	505	510	2.20
Éosine	530	550	2.31
Érythrosine	535	560	3.10
Rose bengale ...	555	570	3.32

La densité optique du mélange colorant sérum-albumine diminue avec le pH dans la région du pH voisine de 9, le phénomène étant parfaitement réversible. La figure 3 montre la densité optique du mélange rose bengale (2,2.10^{-5} M) — sérum-albumine (0,6 mg/cc) en tampon 0,1 M glycocolle — NaCl-NaOH à différents pH. Le colorant lui-même a une densité optique de 0,200 indépendante du pH. Les résultats d'une expérience où la sérumalbumine (0,1 mg/cc) était dialysée contre diverses concentrations de rose bengale en tampon phosphate 0,1 M, pH 7,00 sont représentés sur la figure 4*a* (*r* représente le nombre des molécules de colorants lié à une molécule de la protéine). La technique utilisée était celle de KLOTZ, WALKER et PIVAN [4] et la figure 4*b* représente les résultats obtenus par ces auteurs avec la sérumalbumine et la méthylorange à pH 5,67.

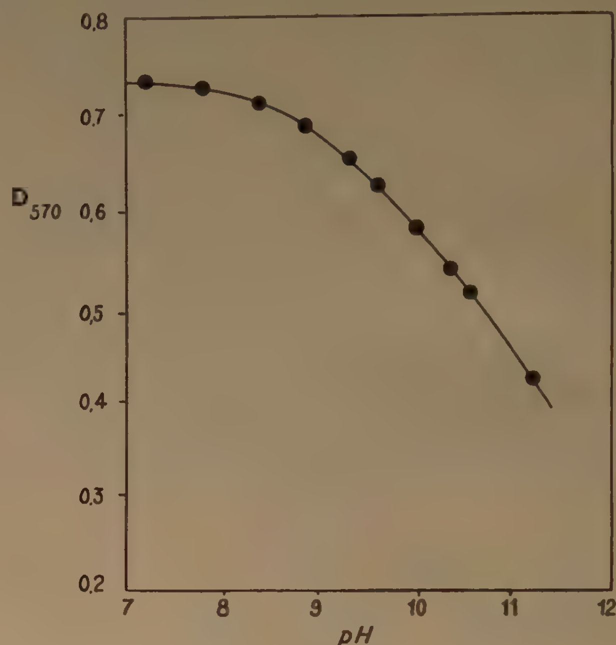


Fig. 3.

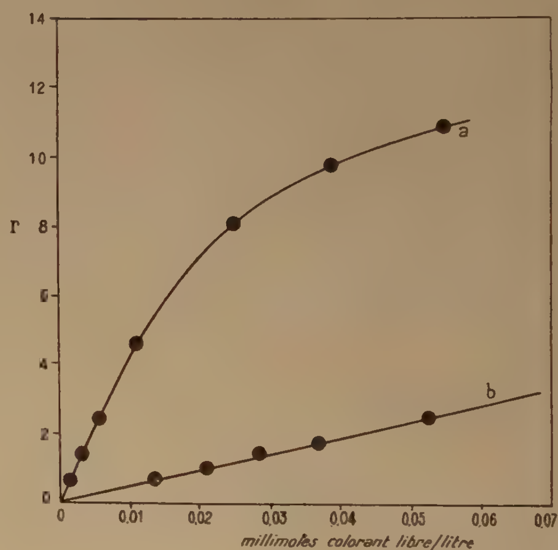


Fig. 4.

Contrairement à la sérumalbumine les protéines natives : ovalbumine, chymotrypsine, virus de la mosaïque du tabac n'ont montré aucun effet à pH 7,0 sur l'altération de la couleur du rose bengale. Avec la lactoglobuline il y a un très léger effet. Toutes ces protéines montrent un changement de coloration

seulement après dénaturation par la chaleur (100°). La densité optique à 570 mμ de la solution de rose bengale en présence d'ovalbumine dénaturée par la chaleur et de la chymotrypsine native à pH 7,0 et 38° diminue graduellement au cours de plusieurs heures. Cette diminution est approximativement linéaire. Toutes les protéines dénaturées montrent une diminution du changement de la couleur en fonction du pH aux environs de pH 9.

Un polyélectrolyte, polyvinylamine (Kodak) provoque aussi un changement prononcé de la couleur de ces colorants ; le changement diminue aux environs de pH 9. Contrairement à la sérumalbumine native, le complexe colorant-polyélectrolyte précipite lentement. Le polyvinyl pyrollidone (I. G. Farben) montre aussi un changement de couleur qui ne diminue pas jusqu'à pH 12.

Discussion. — Le fait que ces quatre colorants ne suivent pas la loi de Beer-Lambert, est dû probablement à la formation de micelles de molécules de colorants qui se dissocient en présence d'acétone ou par chauffage. Par addition de sérumalbumine cependant il n'y a pas simplement dissociation des micelles de colorants (comme semble l'indiquer la diminution de la bosse au voisinage de 500 mμ pour le rose bengale) mais probablement une modification du spectre du colorant lorsqu'il est lié à la protéine. L'altération de la fluorescence quand la sérumalbumine est ajoutée à des solutions de dérivés anioniques de l'acridine a récemment été étudié par WEBER [5] ; ces colorants ont des propriétés voisines de celles des fluorescéines.

La liaison du colorant mise en évidence sur la figure 4 suit l'isotherme de LANGMUIR [6] que l'on peut écrire sous la forme :

$$r = \frac{nc}{K + c}$$

où r est le nombre de molécules de colorants liées à une molécule de protéine pour une concentration moléculaire donnée de colorant libre c. K est la constante de dissociation intrinsèque du complexe colorant-protéine, c'est-à-dire la constante de dissociation pour une molécule de colorant liée dans sa position sur la protéine ; le nombre total de positions sur la protéine disponible pour le colorant étant donné par n. Théoriquement l'équation de LANGMUIR est valable pour tous les systèmes dans lesquels un grand nombre de positions sont disponibles et à condition que les molécules adsorbées n'entrent pas en interaction. (Ce problème a été traité d'une manière statistique complète par FOWLER et GUGGENHEIM [7]). Pratiquement l'équation est valable même pour n égal 4 [8]. Pour déterminer les constantes K et n on trace la courbe r/c en fonction de r [6]. La courbe est linéaire et coupe l'axe des ordonnées pour une valeur égale à n/K et celui des abscisses pour une valeur égale à n. Des données de la figure 4*a* nous trouvons pour le système rose bengale-sérumalbumine $n = 14$ et $K = 2{,}06.10^{-5}$, ce dernier correspondant à une énergie libre à 25° de 6,4 kilocalories par molécule gramme. Les valeurs pour le système méthylorange-sérumalbumine sont

$$n = 22 \quad K = 4{,}48.\ 10^{-4},$$

l'énergie libre correspondante est de 4,6 kilocalories par molécule gramme [4].

En faisant l'hypothèse que le nombre de positions n sur la sérumalbumine est le même pour toutes les fluorescéines, les rapports du nombre de molécules de colorants par molécules de protéines donnés dans le tableau n° 1 mesurent l'affinité du colorant pour la protéine, c'est-à-dire que ces rapports représentent une mesure relative de la quantité minimum de protéine nécessaire pour fixer pratiquement tout le colorant ; ils sont inversement proportionnels aux constantes de dissociation pour ces systèmes colorant-protéine. On voit dans le tableau I que l'affinité du colorant pour la protéine est d'autant plus grande qu'il y a plus d'atomes polarisables sur la molécule de colorant. Ceci amène à penser que la liaison est due au moins en partie à des forces de VAN DER WAALS. On a déjà décrit [9] un accroissement semblable des forces de liaison avec l'allongement des chaînes d'acide gras. La capacité de liaison de diverses substances avec la sérumalbumine a des conséquences importantes dans l'action pharmacologique de ces substances [1] [10] ; la liaison avait été interprétée comme étant due à des forces de VAN DER WAALS [11]. Il y a quelque évidence que même le benzène se fixe sur la sérumalbumine [12].

Les forces de VAN DER WAALS ne peuvent expliquer à elles seules tous les résultats. Comme l'ont montré KLOTZ et URQUHART [13] la liaison du méthylorange à la sérumalbumine décroît au voisinage de pH 9, indiquant que les anions du colorant sont liés normalement aux groupes aminés libres de la lysine dont la neutralisation est effective au voisinage de pH 9. La figure 3 montre clairement cet effet, la courbe suit de très près celle du titrage d'un groupe aminé libre. Cette méthode peut se montrer utile de manière très générale pour le titrage de groupes chargés sur les protéines. Le résultat négatif obtenu avec le polyvinyl pyrollidone en ce qui concerne la

diminution du changement de couleur avec le pH est due probablement aux valeurs élevées du pH de l'azote pentavalent qu'il porte. Le fait que la sérum-albumine lie fortement les anions à l'inverse des autres protéines natives (N. B. les détergents anioniques sont une exception : ils se lient et dénaturent toutes les protéines, pour la revue de ces travaux voir PUTNAM ([14])), a été expliqué pour la sérumalbumine bovine par la grandeur du rapport des groupes aminés à la différence entre les groupes carboxyles et hydroxyles de la protéine ([15]). Cependant un tel rapport dépend beaucoup des erreurs dans l'analyse des acides aminés et de l'ammoniac amidé des protéines et les valeurs obtenues varient avec les données trouvées dans la littérature que l'on prend pour le calculer. Il y a quelques indications ([5]) que la sérum-albumine native à l'encontre de l'ovalbumine native, a un poids moléculaire inférieur quand la valeur du pH est plus élevée que 9, cet effet étant réversible. Il est possible que cet effet puisse produire un affaiblissement de la liaison du colorant avec les protéines, les dimensions de la molécule protéine dépendant de la présence de groupes chargés. Il semble que la présence de groupes aminés est aussi en partie responsable de la liaison des colorants sur les protéines dénaturées. Mais en même temps les groupes capables de fixer les colorants avec des forces de VAN DER WAALS élevées (groupes à longues chaînes et groupes phényl) peuvent devenir accessibles par dénaturation. Dans le cas de la sérumalbumine native, où des groupes aminés libres et des groupes à liaison VAN DER WAALS sont présents entre le pH du point isoélectrique et pH 9, les molécules portent une charge nette négative qui les empêche de précipiter, mais dans le cas de la polyvinylamine toutes les charges sont positives (comparer avec DOBRY ([16])).

L'expérience concernant la digestion enzymatique de l'ovalbumine dénaturée, montre que la liaison des colorants ne se fait pas sur les produits de digestion. Cet effet sera étudié en plus grand détail puisque cette méthode peut être la plus simple pour l'étude des cinétiques de digestion des protéines.

C'est une expérience courante en cytochimie que les colorants cytoplasmiques, éosine et érythrosine, ne colorent pas un substrat si celui-ci n'a pas été « fixé » par la chaleur ou par traitement avec divers agents dénaturants des protéines. Après fixation les colorants se lient fortement au substrat produisant une couleur rouge plus profonde que celle présente en solution.

L'auteur remercie M. René WURMSER de l'avoir reçu dans son laboratoire et de l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Laboratoire de Biologie physicochimique de la Faculté des Sciences.
Institut de Biologie physicochimique, Paris.

BIBLIOGRAPHIE

(1) B. D. DAVIS. — *Amer. Scientist.*, **34**, 611 (1946).
(2) I. M. KLOTZ et J. M. URQUHART. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 847 (1949).
(3) G. OSTER et H. GRIMSON. — *Archives Biochem.*, **24**, 119 (1949).
(4) I. M. KLOTZ, F. M. WALKER et R. B. PIVAN. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **68**, 1486 (1946).
(5) G. WEBER. — Communication personnelle.
(6) I. LANGMUIR. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **40**, 1361 (1918).
(7) R. H. FOWLER et E. A. GUGGENHEIM. — *Statistical Mechanics*, section 1004, Cambridge University Press, 1939.
(8) G. SCATCHARD. — *Ann. N. Y. Acad. Sciences*, **51**, 660 (1949).
(9) P. D. BOYER, G. A. BALLOU et J. M. LUCK. — *J. Biol. Chem.*, **167**, 407 (1947).
(10) B. D. DAVIS. — *J. Chim. Invest.*, **22**, 753 (1943).
(11) B. D. DAVIS et R. J. DUBOS. — *J. exp. med.*, **86**, 215 (1947).
(12) S. BRESLER. — *Biochimiyia*, **14**, 180 (1949).
(13) I. M. KLOTZ et J. M. URQUHART. — *J. phys. Colloid Chem.*, **53**, 100 (1949).
(14) F. W. PUTNAM. — *Adv. Protein Chem.*, **4**, 80 (1948).
(15) I. M. KLOTZ et J. M. URQUHART. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 1597 (1949).
(16) Mme A. DOBRY. — *Bul. Soc. Chim. Belges*, **57**, 280 (1948).

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU RADICAL LIBRE NH
VALEUR EXPÉRIMENTALE DE SON ÉNERGIE DE DISSOCIATION

par G. PANNETIER et A. G. GAYDON

Manuscrit reçu le 17-4-51

SOMMAIRE

Les auteurs ont analysé dans ce mémoire le spectre de chimiluminescence donné par la décomposition de l'acide azothydrique et le spectre d'émission de la combustion de l'ammoniaque dans du fluor. Les spectres contiennent huit nouvelles bandes appartenant à la transition $^3\Pi \rightarrow {}^3\Sigma$ du radical NH. Parmi celles-ci, ils ont pu en prélever un certain nombre appartenant à la branche Q de cette transition et les grouper de façon satisfaisante en un schéma vibrationnel provisoire.

Une extrapolation linéaire de Birge-Sponer donne 4,0 *e. v.* pour l'énergie de dissociation de la molécule NH ; la valeur réelle est probablement plus faible, plutôt plus près de 3,8 *e. v.* que de 4. C'est la première valeur en date de l'énergie de dissociation de cette molécule déduite de résultats purement expérimentaux.

Les bandes (0,0) et (1,1) de la transition électronique $^3\Pi \rightarrow {}^3\Sigma$ du radical NH, dont les têtes de bandes du système Q sont à 3 360 et 3 370 A°, sont les résultats les plus apparents de beaucoup de spectres de flammes. Elles apparaissent chaque fois qu'il y a combustion de substances contenant à la fois de l'hydrogène et de l'azote, tel l'ammoniaque par exemple. On les rencontre également dans les spectres de décharge de mélanges gazeux contenant les mêmes éléments.

Mais aucune autre bande de ce système n'a été signalée et nous n'avions ainsi aucune donnée sur la valeur de la constante vibrationnelle de cette importante molécule. Dans la plupart des cas où l'on observe les bandes précédentes, on obtient simultanément les bandes des radicaux OH et N_2, et celles-ci masquent les bandes de NH qui pourraient exister. Ceci explique l'insuffisance des données concernant cette molécule.

Dans les deux sources de radicaux NH dont nous allons parler par la suite, les bandes du radical N_2 sont absentes et celles de OH n'y existent qu'à l'état d'impuretés.

La première, étudiée par l'un d'entre nous (1) se rencontre dans l'émission provoquée par chimiluminescence dans la décomposition explosive de l'acide azothydrique gazeux N_3H. Déjà Gleu (2) avait, en 1925, spectroscopiquement étudié la décomposition de N_3H et de N_3Cl. Mais, outre que l'interprétation du spectre obtenu était délicate du fait de l'usage d'un mélange, il fut gêné par la vapeur d'eau et laissa échapper l'observation des bandes de longueur d'onde inférieure à 3 200 A°. Il remarqua néanmoins, sous la faible dispersion qu'il utilisait, la présence de deux bandes dégradées vers les U. V. entre 3 740 et 3 755 A°, et d'une troisième à 3 804 A°, mais n'en fit aucune analyse.

Nous avons repris ses expériences avec un appareillage complètement différent.

Ce dernier comprend essentiellement un appareil générateur d'acide azothydrique et un tube à explosions.

Appareillages. — 1. *Production de l'acide azothydrique.* — Pour des raisons de sécurité nous n'avons voulu à aucun moment avoir de l'acide liquide, et nous avons réalisé un dispositif où l'acide est consommé au fur et à mesure de sa production. Pour limiter la violence des explosions nous travaillons sous une pression ne dépassant pas 150 mm de mercure. L'acide azothydrique est aspiré au fur et à mesure de sa production par l'appareil à explosions, lui-même toujours vidé entre deux expériences. Certes, les méthodes habituelles (3), (4) de préparation de l'acide par action sur l'azoture de sodium, N_3Na, de la solution diluée d'acide sulfurique, sont parfaitement au point ; mais elles présentent l'inconvénient dans notre cas particulier, où le vide se fait progressivement dans l'appareil générateur, d'entraîner d'assez grandes quantités de vapeur d'eau. Les colonnes déshydratantes ne réussissent pas à les retenir ; et elles provoquent la présence de très intenses bandes du radical OH qui couvrent toute la zone du spectre au-dessous de 3 200 A°. Dans le but de supprimer cet inconvénient, nous avons préparé l'acide par une méthode inédite en le déplaçant de son

sel de sodium par l'acide phosphorique concentré au maximum de densité $d = 1{,}8$. Bien qu'un tel acide mouille peu l'azoture cristallisé, l'attaque se fait facilement vers 50° sans à coup ni difficulté. Par surcroît de précaution, on déshydrate encore l'acide gazeux par contact prolongé avec de l'anhydride phosphorique sur support inerte (fig. 1).

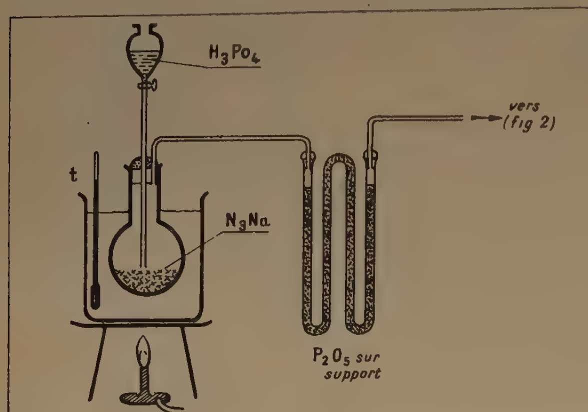


Fig. 1.

2. *Tube à explosions*. — La quantité de lumière émise par une seule explosion est, bien entendu, insuffisante pour impressionner la plaque du spectrographe. Même avec des émulsions très rapides, 5 à 10.000 explosions sont nécessaires pour obtenir un résultat appréciable. Le problème consiste donc à reproduire ces explosions avec une fréquence suffisante, de façon à obtenir un cliché en un temps raisonnable. Le tube dans lequel ont lieu les explo-

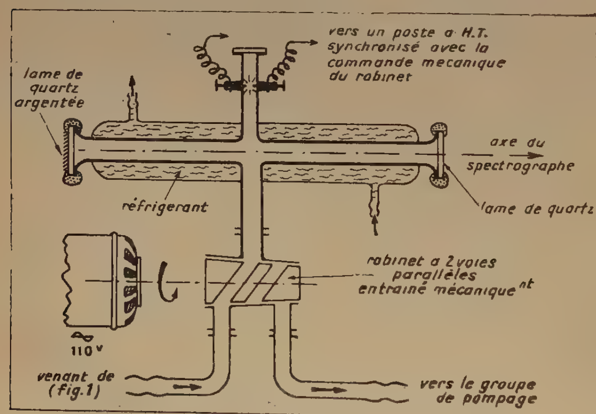


Fig. 2.

sions a une quinzaine de centimètres de longueur et un centimètre de diamètre (fig. 2). Placées suivant l'axe du spectrographe, deux fenêtres de quartz le limitent de chaque côté. Celle, qui est à l'opposé de la fente de l'appareil dispersif, est argentée sur sa face externe et double optiquement la longueur du tube sans augmenter les risques de rupture. Un robinet a deux larges voies parallèles permet, comme l'indique la figure jointe, de mettre ce tube en communication, soit avec le générateur d'acide azothydrique, soit avec un groupe de pompage à gros débit. Une étincelle électrique commandée par la fermeture du robinet jaillit au moment opportun et amorce la décomposition du gaz contenu dans le tube. Un moteur à réducteur de vitesse entraîne ce robinet à la vitesse de 1 à 2 tours par seconde, et commande ainsi automatiquement à chaque tour : l'admission du gaz, sa décomposition et l'évacuation des gaz en résultant.

Résultats. — La figure 3 représente le spectre obtenu au bout d'une dizaine de milliers de ces cycles.

On y note la bande principale (0,0) à 3 063,6 A° du radical OH et celle (0,0) du radical CN à 3 883 A° ; l'une et l'autre sont des impuretés ; la première est due à l'humidité rémanente du gaz azothydrique employé ; celui-ci traverse cependant très lentement un tube desséchant d'environ 150 cm de longueur, d'anhydride phosphorique sur support de porcelaine — et ce déshydratant est encore intact à la fin de l'expérience. L'autre provient de l'attaque de la picéine, servant à cimenter les fenêtres de quartz sur le tube, par l'azote excessivement actif libéré par la décomposition de la molécule N_3H ou des produits intermédiaires en résultant.

En dehors de ces deux seules impuretés, le spectre obtenu contient :

1° Vers 4 200 A° et au-dessus, un spectre de bandes très fines et très nombreuses qui a été identifié avec celui des bandes α de l'ammoniaque, en général considérées comme provoquées par l'émetteur NH_2.

Tableau I

λ en A°	± Δλ	ν en cm⁻¹	I
3.023,0	0,5	33.070	2
3.051,0	0,5	32.767	2
3.054,7	0,5	32.727	2
3.076,2	1	32.498	1
3.360,0 (*)	0,1	29.753	10
3.370,9 (*)	0,1	29.658	9
3.383,5	0,1	29.545	5
3.743,2	0,3	26.708	4
3.752,1	0,3	26.644	3
3.803,8	0,5	26.282	3

(*) Valeurs extraites des mémoires de G. W. Funke, *Zeit. f. Physik*, **96**, 787 (1935) et **101**, 104 (1936).

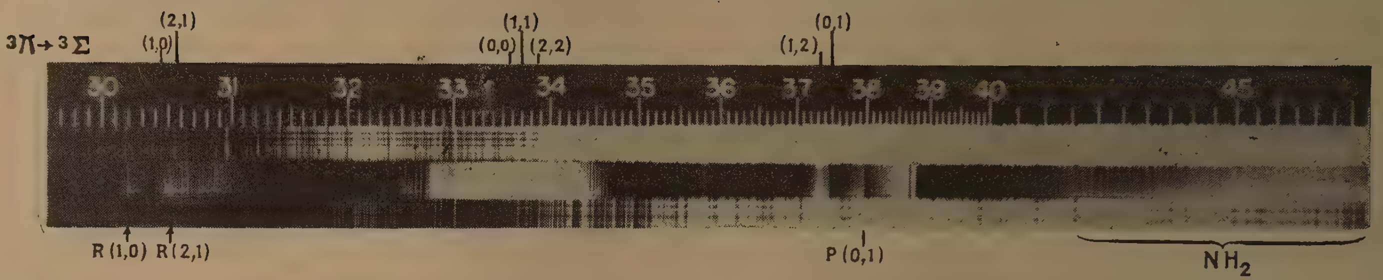

3Π→3Σ
(2,1)
(1,0)
(1,1)
(0,0)
(2,2)
(0,1)
(1,2)
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
45
R(1,0)
R(2,1)
P(0,1)
NH2

Fig. 3.

2° Et plusieurs autres bandes très nettes dégradées soit vers l'U. V. soit vers l'I. R. non encore décelées, et dont les têtes mesurées avec précision variable ont pour longueurs d'onde et intensités les valeurs suivantes : (tableau I) (voir p. 3).

Les six dernières bandes de ce tableau ont été retrouvées par l'un d'entre nous [1] dans un phénomène tout à fait différent : la combustion de l'ammoniaque dans une atmosphère de fluor ; il est même probable que les quatre autres pourraient également être mises en évidence par la même expérience si l'on pouvait préparer cet halogène tout à fait anhydre et n'être pas ainsi gêné, comme dans la décomposition de N_3H par les bandes du radical OH dans la région des 3 000 A°.

Schéma vibrationnel provisoire de la transition $^3\Pi \rightarrow {^3\Sigma}$ du radical NH. — Malgré la faible dispersion du spectrographe utilisé, la structure fine de toutes ces bandes ne laisse aucun doute sur le caractère diatomique de leur émetteur. Il semble qu'à l'exclusion de la première, troisième et dernière, ces bandes constituent la branche Q de la transition électronique $^3\Pi \rightarrow {^3\Sigma}$ du radical NH. On retrouve d'ailleurs sur le même spectre le système $^1\Pi \rightarrow {^1\Delta}$ [6] de ce même radical, avec les deux bandes (0,0) à 3 240 A° et (0,1) à 3 609,6 A°. Chacune des bandes précédentes du tableau I serait d'ailleurs triple et la tête la plus intense, réellement mesurée, appartiendrait à une branche Q_1.

Ces sept têtes de bandes peuvent se ranger dans le tableau à double entrée ci-inclus (tableau II) :

TABLEAU II

V' \ V''	0		1		2
0	29.753	**3.109**	26.644		
	3.014		**3.014**		
1	32.767	**3.109**	29.658	**2.950**	26.708
			2.840		**2.837**
2			32.498	**2.953**	29.545

Celui-ci constituerait pour la transition électronique envisagée, un arrangement provisoire de la branche Q_1, en états vibrationnels voisins.

Quant aux autres longueurs d'onde, il semble qu'elles correspondraient respectivement à des branches R et P de la même transition.

On aurait :

3 023,0 : R(1,0)
3 054,7 : R(2,1)
3 803,8 : P(0,1)

Constantes vibrationnelles et énergie de dissociation de la molécule NH. — De ces résultats expérimentaux et de l'arrangement précédent, on peut déduire par le calcul une valeur approchée de l'énergie de dissociation de la liaison N-H. Certes, les niveaux d'énergie dont nous disposons sont peu nombreux et la seule méthode à laquelle on peut penser est une extrapolation linéaire de BIRGE-SPONER [7]. Encore faudra-t-il considérer le résultat obtenu comme très approché, et vraisemblablement un peu élevé par rapport à la valeur réelle.

Avec les notations habituelles, nous avons pour l'état de départ :

$$\begin{cases} \Delta G''_{1/2} = \omega''_{1/2} = 3\,109 \text{ cm}^{-1} \\ \Delta G''_{3/2} = \omega''_{3/2} = 2\,952 \text{ cm}^{-1} \end{cases}$$

d'où l'on déduit :

$$x''_e \omega''_e = \frac{1}{2} (\omega''_{1/2} - \omega''_{3/2}) = 78{,}5 \text{ cm}^{-1}$$

$$\omega''_e = \omega''_{1/2} + 2x''_e \omega''_e = 3\,266 \text{ cm}^{-1}.$$

De même, pour l'état excité :

$$\begin{cases} \Delta G'_{1/2} = \omega'_{1/2} = 3\,014 \text{ cm}^{-1} \\ \Delta G'_{3/2} = \omega'_{3/2} = 2\,839 \text{ cm}^{-1} \end{cases}$$

d'où

$$x'_e \omega'_e = \frac{1}{2} (\omega'_{1/2} - \omega'_{3/2}) = 87{,}5 \text{ cm}^{-1}$$

$$\omega'_e = \omega'_{1/2} + 2x'_e \omega'_e \quad = 3\,188 \text{ cm}^{-1}$$

L'application de la formule d'extrapolation linéaire de BIRGE-SPONER :

$$D''_0 = \frac{\omega''^2_e}{4x''_e \omega''_e} - \frac{\omega''_e}{2}$$

nous donne pour l'état fondamental :

$$D''_0 = 32\,338 \text{ cm}^{-1}$$

ou : $= 4{,}0$ *e. v.*

ou : $= 91$ *k.* cal/mol

Cette valeur de 4,0 *e. v.* pour D(NH) est probablement un peu trop forte, comme le sont très souvent les valeurs obtenues par cette méthode d'extrapolation linéaire. Nous inclinons à penser que le résultat réel doit probablement être plus près de 3,8 *e. v.* que de 4,0. Toutefois, ce résultat est la seule donnée expérimentale que l'on connaisse pour la dissociation du radical NH ; les seuls résultats qui existent dans la littérature sont des valeurs calculées théoriquement : KING [9] donn 3,42 *e*V et le dernier en date, GLOCKLER [8], 3,74 *e*V Cette dernière valeur est peu éloignée de notre résultat expérimental. L'écart est même faible, en regard de la double imprécision

laissée d'une part par l'extrapolation, et d'autre part, par le fait que nos calculs utilisent les nombresd'ondes des têtes de chaque bande au lieu de leurs origines.

Pour l'état excité, l'extrapolation linéaire nous donne : $D'_0 = 27\,426$ cm⁻¹ ; si on lui ajoute : $\nu_0 = 29.753$ cm⁻¹ ceci donne une limite à 57.180 cm⁻¹, c'est-à-dire à (57 180 — 32 340) cm⁻¹, presque 25.000 cm⁻¹ au-dessus de la limite obtenue par extrapolation linéaire. On en déduit que l'état $^3\pi$ peut évoluer soit vers l'état ^2D de l'azote atomique à 19.202 cm⁻¹, soit vers l'état ^2P à 28.808 cm⁻¹, sans qu'étant donnée la valeur approchée obtenue par l'extrapolation linéaire il nous soit permis de décider avec une certitude absolue lequel des deux est le plus vraisemblable ; il semble cependant que ce soit le premier ; car l'allure de la convergence des niveaux vibrationnels d'énergie croît souvent beaucoup plus rapidement pour les états les plus excités.

Mécanisme cinétique de la décomposition de l'acide azothydrique — Du spectre obtenu dans la décomposition explosive de N_3H, nous pouvons déduire que le mécanisme de cette dissociation comporte nécessairement plusieurs étapes. La première se ferait suivant :



$$N_3H \rightarrow NH^* + N_2$$

avec rupture de la molécule au niveau de l'atome d'azote sur lequel est fixé l'hydrogène ; puis le radical NH réagirait vraisemblablement à son tour pour donner le radical NH_2 par un processus probablement complexe sur lequel nous ne pouvons émettre que des hypothèses très vagues.

Mais ce sont les seuls enseignements cinétiques que nous puissions déduire de l'étude spectrographique de cette chimiluminescence ; et il est hors de doute que la décomposition de l'acide azothydrique fait intervenir en dehors de la première étape signalée, des stades d'évolution plus avancés et inconnus dont la complexité nous est révélée par la seule existence du radical NH_2.

Faculté des Sciences, Paris.
Imperial College of Science, London.

BIBLIOGRAPHIE

(1) G. Pannetier. — *C. R.*, **232**, 817, 1951.
(2) Gleu. — *Zeit. fur Physik*, **38**, 176, 1926.
(3) L. F. Audrieth. — *Chemical Reviews*, **15**, 169, 1934.
(4) Bulletin, nº 2081 du Comité scientifique des Poudres et Explosifs.
(5) R. A. Durie et A. G. Gaydon. — Imperial College of Science, London (résultats non publiés).
(6) R. W. Lundt, R. W. B. Pearce and F. C. W. Smith. — *Proc. Roy. Soc.*, **151**, 602 (1935).
(7) A. G. Gaydon. — Dissociation Energies. Chapman and Hall, London.
(8) G. Glocker. — *J. Chem. Phys.*, **16**, 602 (1948).
(9) G. W. King. — *J. Chem. Phys.*, 378 (1938).

MESURES DE RADIOACTIVITE A L'AIDE DE SOLIDES FLUORESCENTS NON CRISTALLINS

L. PICHAT ET Y. KOECHLIN
(Commissariat à l'Énergie Atomique, Service de Chimie-Physique et Division des Constructions Électriques)
Manuscrit reçu le 25/4/51

RÉSUMÉ

Dans un ensemble « compteur à scintillations » le tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3 (TPB) en solution solide à 2 % dans le polystyrolène est avantageux et supérieur aux solutions solides de *p*-terphényl, anthracène et stilbène préconisées par d'autres auteurs, aussi bien qu'à la solution saturée de TPB dans le xylène. Il est équivalent à la solution de terphényl dans le xylène.

Dans tout le domaine exploré de 0,1 % jusqu'au cristal pur, l'intensité moyenne des scintillations croît linéairement avec le logarithme de la concentration du TPB, la pente des droites représentatives étant très voisine de 2/3.

Le comptage par scintillations et en particulier celui des photons γ nécessitait à l'origine l'emploi de cristaux organiques de grandes dimensions dont la préparation n'est pas toujours aisée. C'est pourquoi Kallman (1) et d'autres auteurs ont orienté leurs recherches vers les « phosphores » liquides plus faciles à préparer.

L'utilisation des « phosphores » solides non cristallins a été décrite par M. G. Shorr et F. L. Torney (2) qui, les premiers, ont montré qu'une solution solide à 2 % de *p*-terphényl dans le polystyrolène est un bon compteur à scintillations. Plus récemment Koski (3) a annoncé que des solutions solides à 2 % d'anthracène ou stilbène dans le polystyrolène donnent des résultats comparables à ceux des monocristaux d'anthracène ou stilbène.

Nous avons préparé et étudié de ce même point de vue un certain nombre d'hydrocarbures aromatiques en solution solide dans le « plexiglass » et le polystyrolène.

Ces solutions solides ont toutes été obtenues par polymérisation lente soit :

a) d'une solution de l'hydrocarbure dans le styrolène monomère ou le méthacrylate de méthyle avec irradiation par U. V., soit

b) avec 1 ‰ de peroxyde de benzoyle comme catalyseur, sans U. V.

Les polymères préparés selon *a*) jaunissant et comptant moins bien que ceux fournis par la méthode *b*), cette dernière a été finalement adoptée.

Parmi tous les produits étudiés le meilleur est le tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3 (abrégé en TPB) dans le polystyrolène (tableau II) qui permet, jusqu'à la concentration de 2 % en poids, l'obtention de masses bien transparentes à fluorescence bleu pâle. Cette concentration est très voisine de la saturation du tétraphényl butadiène dans le styrolène vers 50°C. L'emploi de ce composé dans un ensemble compteur à scintillations n'avait pas, à notre connaissance, été signalé jusqu'ici, bien que Strauss dès 1918 (4) en ait étudié la fluorescence sous l'influence des rayons du radium. Son efficacité est comparable à celle d'une solution saturée de *p*-terphényl dans le xylène, mais nettement supérieure à celles du *p*-terphényl, de l'anthracène ou du stilbène dans le polystyrolène signalées par les auteurs précités (tableau II). Nos résultats sont reproductibles d'une préparation à l'autre pour des échantillons à la même concentration, faits à partir du même lot de TPB et de styrolènes de provenances différentes.

Le nombre d'impulsions lumineuses provoquées par une source donnée dans un volume donné du produit croît avec la concentration (fig. 1 et 2) comme dans le cas du naphtalène en solution dans le *m*-xylène sans présenter le maximum signalé dans le cas de l'anthracène dissous dans le xylène (5).

Les courants fournis (voir partie expérimentale) par les scintillations d'une lamelle du butadiène à 2 % dans le polystyrolène et d'un cristal d'anthracène de mêmes dimensions sont dans le rapport 0,314.

Les solutions solides de divers hydrocarbures dans le « Plexiglass » sont peu efficaces. Le TPB est encore le meilleur de tous ceux que nous avons essayés mais,

sans atteindre, et de loin, les rendements de luminescence de sa solution dans le polystyrolène (tableau I)(*).

Nous avions antérieurement obtenu [10] de petits monocristaux limpides de tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3. Un de ceux-ci a été comparé avec un cristal d'anthracène de mêmes dimensions. Les courants fournis par les scintillations de ces deux cristaux sont dans le rapport 0,587 (voir partie expérimentale).

De plus on a comparé (fig. 1) des parallélépipèdes de solutions solides à diverses concentrations de tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3 dans le polystyrolène avec un cristal pur de mêmes dimensions.

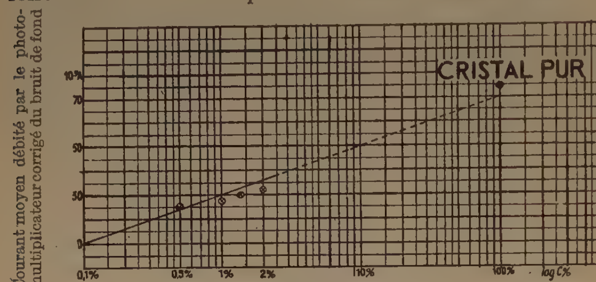


Fig. 1. — *Tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3 dans le polystyrolène.*

Effet de la concentration et comparaison avec un cristal pur.
Dimensions des « cristaux » : 6 × 10 mm — épaisseur : 4 mm.
Photomultiplicateur RCA 931 A — 1400 V.
Peroxyde de benzoyle : 1 °/₀₀ catalyseur.
Source de radium : 50 μc.

En portant le courant moyen débité par le photomultiplicateur en fonction du logarithme de la concentration en poids de la substance fluorescente on obtient une droite dont le prolongement passe par le point correspondant au cristal pur (concentration 100 %) (cf. partie expérimentale et fig. 1).

Cette comparaison directe complète et confirme une comparaison indirecte effectuée antérieurement et détaillée plus loin (cf. partie expérimentale et fig. 2).

Dans ces deux séries d'exemples les droites figurées ont respectivement pour équations (I en 10^{-9} A ; c en % en poids) $I = 140 + 90 \log c$ et $I = 30 + 20 \log c$, ou, en prenant pour unité dans chaque cas l'intensité I_0 donnée par un scintillateur de concentration 1 % ($\log c = 0$)

$$\frac{I}{I_0} = 1 + 0{,}65 \log c \quad \text{et} \quad \frac{I}{I_0} = 1 + 0{,}67 \log c.$$

(*) Nous parlons ici de « solutions » du TPB dans le plexiglass et le polystyrolène sans préjuger du mécanisme de formation du plastique, et sans exclure la possibilité que le tétraphényl butadiène y intervienne, par copolymérisation.

Notons cependant que le spectre de fluorescence des plastiques diffère peu de celui du solide pur, d'après les premiers essais effectués, au Laboratoire de Recherches Physiques de la Sorbonne, par MM. J.-P. Mathieu et Pesteil que nous remercions ici de leur concours.

La concordance est satisfaisante entre les deux équations réduites représentant deux séries de mesures faites sur des barreaux de dimensions différentes mais provenant, pour chaque concentration, d'une même préparation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation et purification des substances employées

(avec la collaboration expérimentale de J. Clément)

Le méthacrylate de méthyle est obtenu par décomposition vers 300°C du « Plexiglass » commercial [6].

Le styrolène monomère commercial est distillé deux fois sous 100 mm.

Peroxyde de benzoyle. — Recristallisation dans le chloroforme.

Anthracène. — Purification du produit commercial successivement par cristallisations dans le toluène, codistillations à l'éthylène glycol et finalement par chromatographie sur alumine activée.

Trans stilbène. — Purification du produit commercial par 4 recristallisations dans l'alcool à 95 %, chromatographie sur alumine et sublimation sous vide poussé.

Diphénylacétylène (Tolane). — Préparé selon la méthode de Schlenk et Bergmann [7] puis purifié par distillations sous pression réduite, cristallisations dans l'alcool à 95 % et distillations sous vide poussé.

Triphényléthylène (α-Phénylstilbène). — Préparé selon Organic Syntheses [8] puis purifié par cristallisations dans l'alcool à 95 % et distillations sous vide poussé.

Tétraphényl-1-2-3-4 *butadiène*-1-3. — Préparé par action du lithium sur le diphénylacétylène en solution dans l'éther anhydre selon Smith et Hoehn [11]. Purification par cristallisations dans le toluène. Point de fusion 185°C (corrigé).

p-Terphényl. — Purification du produit commercial par cristallisation dans l'acétone.

Tétraphényl-1-1-4-4 *butadiène*-1-3. — Aisément préparé par la méthode de Valeur [9] avec des modifications de détail, puis purifié par cristallisations successives dans le toluène, décoloration par du charbon actif et sublimation sous vide poussé.

Polymérisation. — Des essais préliminaires ont montré que les polymérisations soit du méthacrylate de méthyle soit du styrolène doivent être conduites à une température déterminée si l'on veut éviter la formation de bulles dans la masse. Les solutions

d'hydrocarbure et de peroxyde de benzoyle (1 ‰) dans le monomère sont placées dans des tubes à essais. Ceux-ci sont scellés puis immergés dans un thermostat à 52°C. Les temps de polymérisation varient avec la nature de la substance dissoute et sa concentration. Dans le cas du TPB dans le polystyrolène la polymérisation dure environ 10 jours pour une concentration de 2 %. La polymérisation achevée, l'enveloppe de verre est brisée et l'on découpe des barreaux de diamètre 16 mm., longueur 39-40 mm.

TABLEAU I

Solutions solides dans le « Plexiglass » Barreaux diamètre = 16 mm, hauteur 39 mm.

Substance dissoute	Concentration %	B. F. du P. M. en 10^{-9} A	B. F. du P. M. muni du barreau en 10^{-9} A	Scintillations du barreau + B. F. du P. M. et du barreau en 10^{-9} A
Tolane	9	10	10	15
	20	10	10	15
Triphényléthylène	20	10	12,5	15
	42	10	12,5	17,5
p-terphényl	0,6	10	10	22,5
Anthracène	1	10	12,5	15
Tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3 (TPB)	2,4	10	12,5	25

TABLEAU II

Solutions solides dans le polystyrolène Barreaux diamètre = 16 mm, hauteur = 39 mm.

Substance dissoute	Concentration %	B. F. du P. M. en 10^{-9} A	B. F. du P. M. et du barreau en 10^{-9} A	Scintillations du barreau + B. F. du P. M. et du barreau en 10^{-9} A
Tolane	17	10	10	17,5
p-terphényl	~ 1	10	12,5	20
α-phénylstilbène (*)	20	3	6	24
Anthracène	0,1	3	6	33
	0,5	3	6	33
	1	3	6	36
Tétraphényl-1-2-3-4 butadiène-1-3	0,1	6	9	30
	0,5	6	9	30
	1	6	9	30
	1,5	6	9	33
	2	6	9	30
Stilbène	2	6	9	60
Tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3 (TPB)	0,1	9	12	60
	0,5	9	12	130
	1	9	12	150
	2	12	15	180**
Solution saturée dans le xylène		6	9	30
Solution saturée de *p*-terphényl dans le xylène	saturation	10	12,5	187

(*) Dimension du barreau : diamètre = 16 mm, hauteur = 30 mm.

Essais de scintillations. — On utilise un photomultiplicateur RCA 931 A (photocathode type S_4 (*)) et on mesure les diverses amplitudes du courant moyen débité par le photomultiplicateur éclairé successivement par différents barreaux fluorescents irradiés dans une géométrie déterminée par une source de radium de 50 μc.

Les tableaux I et II indiquent les courants correspondants :

(*) Dépôt de Cs_3Sb, sensibilité maxima à 4000 Å, nulle à 7000 Å.

a) Au bruit de fond du photomultiplicateur seul alimenté à la tension de fonctionnement 1400 V.

b) Au bruit de fond total du photomultiplicateur muni du barreau fluorescent étudié.

c) A ce dernier augmenté des scintillations provoquées dans le barreau par le rayonnement de la source de radium (rayons γ et fraction des rayons β traversant 0,5 mm de cuivre).

L'influence de l'état de la surface fluorescente la plus éloignée de la fenêtre du photomultiplicateur est mise en évidence par les valeurs suivantes obtenues avec l'échantillon marqué ** dans le tableau II :

Surface polie : courant $i = 180 \times 10^{-9}$ A.
Surface translucide : courant $i = 200 \times 10^{-9}$ A.
Avec réflecteur aluminium sur surface translucide : courant $i = 275 \times 10^{-9}$ A.

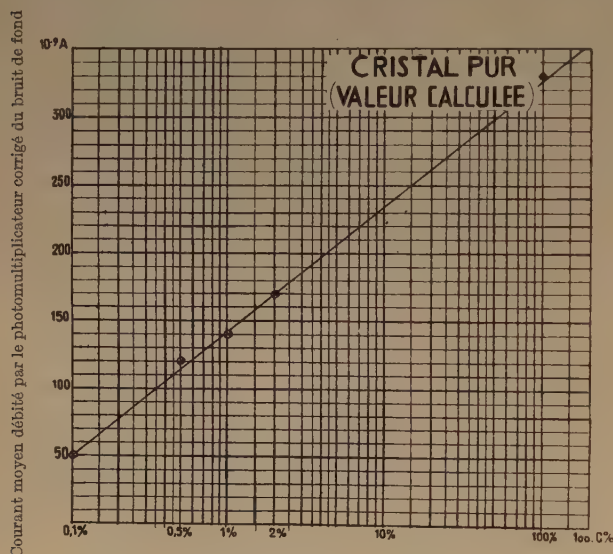


Fig. 2. — *Tétraphényl-1-1-4-4 butadiène-1-3 dans le polystyrolène.*

Effet de la concentration et comparaison avec un cristal pur.
Dimensions des « cristaux » : ø = 16 mm — h = 39 mm.
Peroxyde de benzoyle : 1 ‰ catalyseur.
Source de radium : 50 μc.
Photomultiplicateur RCA 931 A — 1400 V.

Avec la même source, mais dans une géométrie source, cristal, P. M. différente de celle adoptée pour la comparaison des barreaux (tableaux précédents) on a relevé les courants suivants (bruit de fond de 10.10^{-9} A déduit) pour :

a) Un cristal d'anthracène (épaisseur 2 mm, surface 1,7 cm²) irradié par les γ du Ra :

$$i_1 = 255 \times 10^{-9} \text{A}.$$

b) Une rondelle de polystyrolène à 2 % de TPB (épaisseur 2 mm, surface 2 cm²) irradiée dans les mêmes conditions : $i_2 = 80 \times 10^{-9}$ A.
soit un rapport $i_2/i_1 = 0,314$.

c) Un cristal de TPB (6 × 10 mm, épaisseur 4 mm) et un cristal d'anthracène de mêmes dimensions. On a respectivement : 80×10^{-9} A et 135×10^{-9} A.
Soit un rapport 0,587.

En admettant que les rapports ainsi trouvés soient indépendants du volume du scintillateur le courant moyen calculé à l'aide des résultats ci-dessus pour un cristal de TPB de mêmes dimensions que les barreaux du tableau II et en considérant celui marqué ** serait :

$$i = \frac{170}{0,314} \times \frac{80}{135} = 321 \times 10^{-9}\text{A}$$

d) Des parallélépipèdes (6 × 10 mm, épaisseur 4 mm) de solutions solides à diverses concentrations de TPB dans le polystyrolène et un cristal pur (fig. 1).

concentrations	i en 10^{-9} A
0,1 %	10
0,5	25
1	27,5
1,5	30
2	32,5
cristal pur (100 %)	75

BIBLIOGRAPHIE

(1) H. Kallman. — *Phys. Rev.*, **78**, 621 (1950).
(2) M. G. Schorr et F. L. Torney. — *Phys. Rev.*, **80**, 474 (1950).
(3) Koski. — *Bull. Amer. Phys. Soc.*, **26**, 30 (1951).
(4) Strauss. — *Ber.*, **51**, 1466 (1918).
(5) P. D. Johnson et F. E. William. — *Phys. Rev.*, **81**, 146 (1951).
Ageno, Chiozzotto et Querzoli. — *Phys. Rev.*, **79**, 720 (1950) ;
H. Kallman et M. Furst. — *Phys. Rev.*, **79**, 857 (1950).
(6) Vogel. — *Textbook of pratical organic chemistry*, p. 886.
(7) Schlenk et Bergmann. — *Ann. der Chemie*, **463**, 76 (1928).
(8) *Org. Syntheses Coll.*, vol. II, p. 606.
(9) Valeur. — *Bull. Soc. Chim. France*, **29**, 687 (1903) ;
Wittig Lupin. — *Ber.*, **61**, 630 (1928).
(10) C. Baret, H. Héring, L. Pichat, J. Thommeret. — Fabrication de monocristaux d'hydrocarbures aromatiques. Rapport C. E. A., nº 74.
(11) L. I. Smith et H. H. Hoehn. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 1184 (1941).

COLLOQUES INTERNATIONAUX TENUS A L'OCCASION DU CINQUANTENAIRE DE LA DÉCOUVERTE DU RADIUM

(suite et fin)

RÉACTIONS D'HYDROXYLE

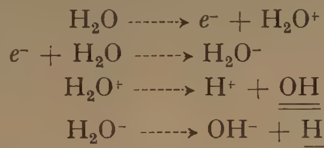
par le Professeur A. H. W. ATEN Junior, Instituut woor Kernphysisch Onderzoek, Amsterdam.

L'action des rayons ionisants sur les solutions aqueuses peut être en général considérée comme une oxydation ou une réduction primaire suivie d'autres processus. Comme l'a montré J. Weiss, ces phénomènes s'expliquent très bien par l'hypothèse que l'activation de l'eau consiste en la formation de radicaux d'hydroxyle et d'atomes d'hydrogène. Dans le cas des solutions oxydables, si l'air a été rigoureusement éliminé, ce sont les radicaux OH qui agissent, et très souvent avec formation d'un nouveau radical :



$$\underline{\underline{OH}} + HCOOH \longrightarrow H_2O + \underline{\underline{COOH}}$$

Il ne semble exister aucun doute, qu'au moins une partie de ces radicaux ont leur origine dans l'ionisation primaire des molécules d'eau par le rayonnement. Comme l'a dit L. H. Gray, le fait que les ions, H^+ et OH^- sont des éléments normaux dans l'eau, nous permet de considérer les ions H_2O positifs et négatifs comme équivalents à des radicaux libres :



$$H_2O \longrightarrow e^- + H_2O^+$$
$$e^- + H_2O \longrightarrow H_2O^-$$
$$H_2O^+ \longrightarrow H^+ + \underline{\underline{OH}}$$
$$H_2O^- \longrightarrow OH^- + \underline{\underline{H}}$$

D'ailleurs l'ionisation ne constitue pas la seule possibilité d'obtenir des radicaux libres. L. H. Gray a estimé que la quantité d'énergie répartie dans l'eau par paire d'ions formés monte à environ 28 eV, tandis que l'énergie nécessaire à l'ionisation d'une molécule d'eau est seulement de 12,6 eV, c'est-à-dire, moins que la moitié, Sans doute une partie de la différence servira à activer un certain nombre de molécules d'eau. Naturellement on doit considérer la possibilité que les molécules aussi peuvent se dissocier, mais sans passer par l'état ionisé. Ce processus augmente le nombre des hydroxyles et des atomes d'hydrogène, mais cette formation est bien différente de la première. Tandis que les radicaux complémentaires formés par les ions sont séparés par des distances assez grandes, les radicaux produits par l'activation sont toujours produits par des couples. En phase gazeuse ces derniers radicaux peuvent exercer une activité chimique, mais on croit que dans les liquides la structure à cage les empêche de s'éloigner l'un de l'autre et les force à se récombiner. Cette considération conduit à l'idée, que le rendement d'une oxydation ou d'une réduction en milieu aqueux ne pourrait pas dépasser un équivalent par molécule d'eau ionisée. Il est intéressant de noter à ce propos que récemment Miller a trouvé que les résultats de Fricke, de Shishacow et de lui-même sont concordants en ce qui concerne le nombre de deux ions ferreux oxydés pour chaque molécule d'eau ionisée en l'absence d'air. Il me semble qu'il se présente ici une difficulté réelle, et qu'on devrait comparer les oxydations radiochimiques aux oxydations obtenues avec les radicaux d'hydroxyle d'origine chimique.

Le phénomène dont on peut se servir pour cette comparaison est celui de la *protection*. Si un radical d'hydroxyle est formé dans une solution contenant deux substances réductrices, tous les deux peuvent réagir. Ceci veut dire, que chacune est oxydée à un degré moindre que si elle était présente seule. La théorie de ce phénomène, connue depuis longtemps en radiochimie, est très simple. Si l'on pose Z_1 pour le nombre des collisions entre un seul radical et les molécules d'une substance oxydable dont la concentration est $1,C_1$ pour la concentration actuelle de la substance réductrice et si P_1 représente la probabilité de réaction d'un radical pendant une collision, on obtient pour la chance de réaction d'un radical pendant une seconde $C_1.Z_1.P_1$. La proportion des nombres de molécules oxydées de deux substances différentes est égale à $\frac{C_1 \cdot Z_1 \cdot P_2}{C_2 \cdot Z_2 \cdot P_2}$. Dans cette expression les concentrations sont variables, mais Z.P est une constante pour chaque composé. Elle détermine la protection radiochimique mutuelle en solution aqueuse. On dispose déjà à présent de résultats d'un certain nombre de mesures de cette sorte, dont on trouve un résumé dans le livre de D. E. Lea.

Il est évident que l'origine des radicaux d'hydroxyle ne peut influencer cette distribution. Ainsi

une comparaison de la protection mutuelle contre les radicaux d'hydroxyle d'origine chimique et contre l'oxydation radiochimique nous fournira des arguments pour juger si cette dernière est due entièrement aux radicaux d'hydroxyle ou non. Pour cette raison nous avons commencé à déterminer des facteurs de protection contre les radicaux OH, obtenus par des processus chimiques.

Les hydroxyles libres sont produits, comme l'ont montré Haber et Weiss, quand on mélange des solutions de sulfate ferreux et d'eau oxygénée.



$$Fe^{++} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+++} + OH^- + OH.$$

Le pouvoir oxydant de ce mélange a été étudié, il y a plus de vingt ans, par Wieland et ses élèves. Wieland a observé qu'en présence d'autres matières réductrices pour chaque équivalent de sulfate ferreux plusieurs équivalents de H_2O_2 peuvent être consommés et il a observé ce phénomène avec un grand nombre de composés simples reducteurs comme les formiates, les phosphites, les hypophosphites et les arsénites.

Plus tard Weiss a remarqué que cela signifie qu'on a affaire à des réactions en chaîne, et il a formulé l'oxydation de l'acide formique de la façon suivante.



$$\underline{\underline{OH}} + HCOOH \longrightarrow H_2O + \underline{\underline{COOH}}$$



$$\underline{\underline{COOH}} + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + CO_2 + \underline{\underline{OH}}$$

Pour les autres réactions étudiées par Wieland on peut écrire des équations analogues.

L'existence de chaînes en présence d'un grand excès de sulfate ferreux représente déjà une protection des ions ferreux. Mais comme la cinétique de ces oxydations n'est pas encore bien connue, il est impossible dans la plupart des cas de calculer le facteur P.Z à partir des expériences avec le sulfate ferreux et un seul autre composé oxydable. Si, au contraire, le sulfate est versé dans une solution d'eau oxygénée contenant deux réducteurs différents, l'analyse des produits de la réaction permet de déterminer la protection mutuelle de ces deux composés. En utilisant ce principe nous avons fait quelques expériences, dont les résultats sont contenus dans le tableau suivant

$$\frac{(Z.P)_{HCOOH}}{(Z.P)_{H_3PO_3}} < 0.05$$

$$\frac{(Z.P)_{(COOH)_2}}{(Z.P)_{C_6H_6}} < 0.2$$

$$\frac{(Z.P)_{HCOOH}}{(Z.P)_{C_6H_6}} < 0,2$$

On doit d'ailleurs admettre qu'il est possible, bien que ce ne soit pas très probable, que dans certaines oxydations de ce type la propagation des chaînes n'est pas due aux hydroxyles, mais à d'autres radicaux. On peut éliminer cette incertitude par le raccourcissement des chaînes jusqu'à ce qu'on arrive à un point où les radicaux secondaires sont presque tous éliminés par des ions ferreux. Ce principe permet très bien d'éliminer les doutes sur ce sujet, quoique le grand excès d'ions ferreux qu'il exige, le rend compliqué du point de vue expérimental.

Il y a encore un détail qui mérite d'être remarqué. Le premier produit de la réaction entre un OH libre et une molécule est toujours un autre radical. Dans les oxydations radiochimiques ces radicaux peuvent être oxydés par des hydroxyles libres formés par l'irradiation, et si cela ne se passe pas, ils sont obligés de se recombiner entre eux. Au contraire dans les oxydations du type de Wieland un excès d'eau oxygénée est toujours présent et si la concentration de celle-ci est suffisante tous ou presque tous les radicaux formés peuvent être oxydés. A ce point de vue ces oxydations sont plus semblables aux processus engendrés par les radiations dans les systèmes biologiques qu'à ceux qui se produisent dans les solutions simples, car les tissus vivants contiennent toujours des enzymes qui peuvent oxyder les radicaux formés.

SUR LES RADICAUX LIBRES PRODUITS PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS EN MILIEU AQUEUX

par le Dr. Joseph WEISS, de l'Université de Durham, Department of Chemistry, King's College

---

I féal greathy honoured to be in a position to give to this distinguished gathering a brief account of our more recent experimental work. Time is very short and I shall not be able to enter into any theoretical discussions.

It has been mentioned already several times before that, — as first suggested in 1944 (1) — in the action of ionising radiations on water OH radicals and H atoms are formed according to the net process (1) (2) :



$$H_2O \longrightarrow H + OH$$

Although the exact mechanism of this process is by no means established, we now possess good evidence for the formation of atoms and free radicals.

Dainton and Magat have used the polymerisation technique for the detection of the free radicals. We have used a different method for the OH radicals, which is rather specific and embodies a number of other points of interest.

If OH radicals are actually formed in the irradiation of water, it should be possible to incorporate them into other molecules : e. g. in the irradiation of a dilute solution of benzene in water with X-rays, — under conditions where molecular oxygen is completely excluded, — phenol is formed, thus showing clearly that the OH group originates from the water. Thus we were able to isolate from the irradiated solutions phenol and diphenyl (3) (4).

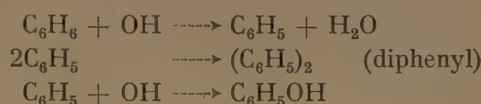
The reaction was also studied under different conditions, viz.

(*i*) in a vacuum, where H and OH are present

(*ii*) in the presence of molecular oxygen, where H atoms can react according to $H + O_2 \longrightarrow HO_2$

(*iii*) in the presence of molecular hydrogen, where OH radicals react according to $OH + H_2 \longrightarrow H_2O + H$, thus transforming the OH into H to a greater or lesser extent.

On the basis of these experiments we were able to propose the following simple mechanism for the reaction between OH radicals and benzene : (4) (5)



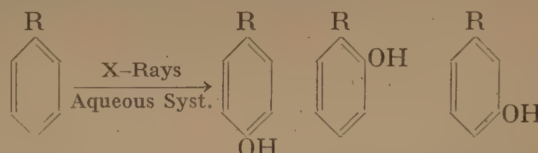
$$C_6H_6 + OH \longrightarrow C_6H_5 + H_2O$$
$$2C_6H_5 \longrightarrow (C_6H_5)_2 \quad \text{(diphenyl)}$$
$$C_6H_5 + OH \longrightarrow C_6H_5OH$$

and possibly also



$$C_6H_6 + C_6H_5 \rightarrow (C_6H_5)_2 + H$$

Recently we carried this work a stage further by studying the action of X-rays on solutions of several mono-substituted benzene derivatives such as phenol, nitrobenzene, benzoic acid, etc (5). We found that the hydroxylation of these compounds depends on the existing substituent, but that in general all three isomeric hydroxy-compounds (*o*, *m* and *p*) are formed in a definite ratio depending also to some extent on the pH of the solution.



In the case of nitrobenzene this is further illustrated by the following *Table I.*

TABLE I. — *Yield of nitrophenols at different pH values in 200 ml. of saturated solutions of nitrobenzene in water.*

(Dose : 3·5 × 10⁴ E. U., given in the presence of air.)

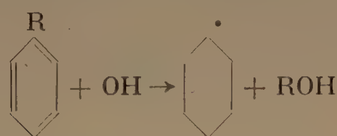
pH	Total nitrophenols (mg.)	Percentage of total		
		o.	m.	p.
2	1.23	34.5	31	34.5
6	1.07	35.5	29	35,5
12	0.90	27.5	27	45.5

We have also studied some of the reactions with OH radicals produced chemically, e. g. according to the reaction of Haber and Weiss (6)



$$H_2O_2 + Fe^{2+} \dashrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH$$

Under these conditions the hydroxyl compounds are again formed and furthermore the ratio of the isomers is very similar to those obtained with X-rays, showing in many cases quantitative agreement and thus giving a much more rigorous proof that in both cases a similar free radical mechanism is operative. Apart from the formation of hydroxylated compounds, we have also observed an elimination of the original substituent according to :



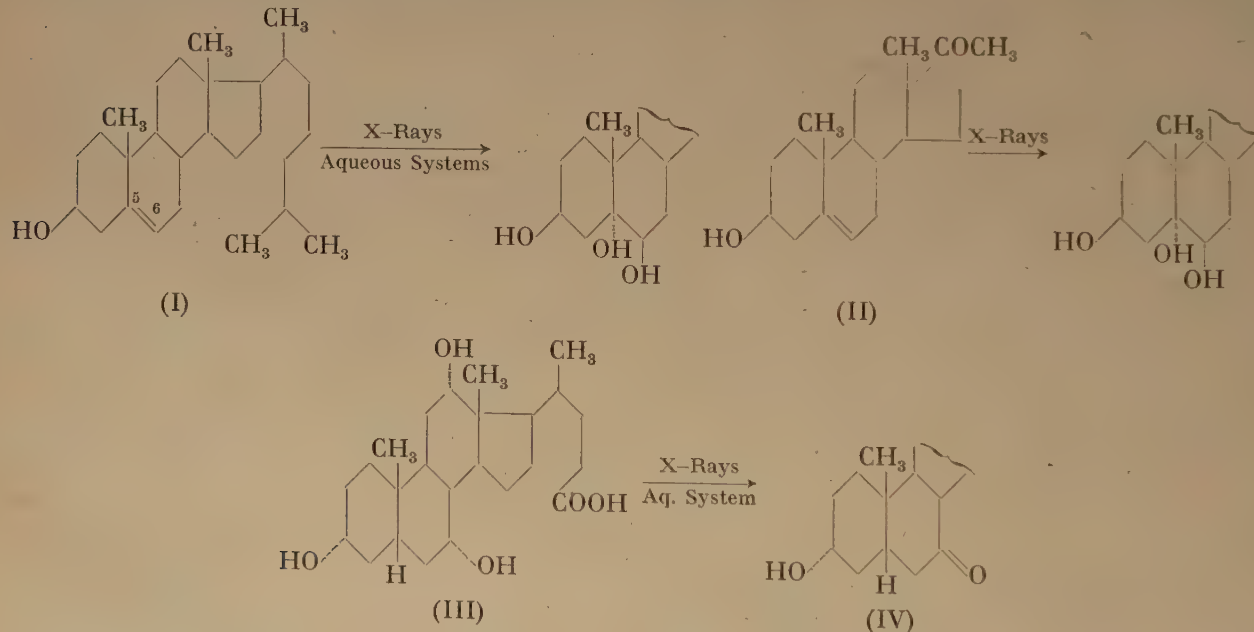
The phenyl radicals thus formed can then give phenol and diphenyl as indicated above.

I should like just to mention that the study of the ratios of the isomeric phenolic compounds is also of some interest from a biological point of view, since it is well known that these benzene derivatives are also hydroxylated under biological conditions. Thi- will be dealt with in a forthcoming publication by Dr. Stein and myself (7).

I would like to mention one other instance where OH radicals are built into molecules under the action of ionising radiations. As we have found, this occurs frequently in the *radiation chemistry of sterols*, which is of considerable biological interest.

Our object in this work was to study the mechanism of the chemical changes produced by ionising radiations on sterols in aqueous systems and, first of all, to isolate the substances formed and to characterize them by unambiguous methods. This work was carried out in collaboration with D. M. Keller (8) (9).

Irradiation of cholesterol (I), and of pregnenolone (II) in aqueous systems leads to a hydroxylation of the double bond in the 5-6 position, resulting in the formation of the corresponding (trans) — triols. In the case of cholesterol we have also isolated compounds produced by the attack on the 7-position. Irradiation of cholic acid (III) in aqueous systems (10) leads to the formation of 7-keto-cholanic-acid (IV) ; this is of considerable interest as it actually corresponds to the first step in the biological oxidation of cholic acid.



I should have liked to say something about our work on amino-acids. I want to mention only that we have observed not only an oxidative deamination by the OH radicals, leading to the formation of ammonia, the corresponding aldehyde and CO_2, — all of which have been isolated and determined quantitatively, — but we have established also a deamination by hydrogen atoms, which is parallelled by certain well-known biological (reductive) deaminations (11) (12).

In conclusion I would like to mention very briefly some of our results on *nucleic acids*. Earlier work has been mainly concerned with the X-irradiation of desoxyribonucleic acid in aqueous systems. Taylor, Greenstein and Hollaender ([13]) have shown that depolymerisation takes place, but no chemical change were observed.

Our first object was to get some information regarding chemical effects and, if possible, to isolate some breakdown products. By employing doses of the order of 10^6r-units we have established deamination and ring-fission of the constituent bases, liberation of inorganic phosphate and of free purines and an increase in the amount of titratable acid groupings ([14]). These changes are again rather similar to those produced by OH radicals generated chemically.

It might be argued that results obtained with these high doses are of little interest from a biological point of view. We have therefore irradiated nucleic acid solutions with doses of the order of 10.000 to 100.000 r-units and we have again been able to detect similar chemical changes ([15]). Indeed free phosphate could be detected after a dose as low as 4.000 r. Table II. gives some figures regarding the yields of ammonia from yeast nucleic acid (commercial sample from B. D. H.) under different experimental conditions.

TABLE II. — *Yeast Ribose nucleic acid B. D. H.* (Na-salt, 0,05 %) irradiated with X-rays (200 kV).

Dose (r-units)	Yields of ammonia (Moles × 10^6 per 100 ml.)		
	In oxygen 1 atm.	In vacuum	In hydrogen 1 atm.
3.0 × 10^4	1.5	0.65	0.50
7.5 × 10^4	3.7	1.60	1.20
12.0 × 10^4	6.2	2.55	1.90

The yield of ammonia decreases as one goes from an atmosphere of oxygen (1 atm.) to a vacuum and to molecular hydrogen (1 atm.). Similar results were obtained also with desoxy ribose nucleic acid (sample kindly supplied by Prof. R. Signer), and also with e. g. adenine. As the result of our extended work we conclude that the production of ammonia by X-irradiation of nucleic acids in solution is due to an attack on the consistuent bases by the oxidative radicals (OH and HO_2). The loss of the high viscosity on irradiation may well be connected with the breaking of these bonds. We have also studied in some detail the concomittant dephosphorylation and there are some indications that hydrogen atoms may play some part in the mechanism of this reaction.

Recent experiments have also shown that effects of ionising radiations on the various linkages in the polynucleotide chain can be demonstrated by the X-irradiation of the simpler constituents such as the free purine and pyrimidines, the nucleosides and the nucleotides. Ring fissions of the heterocyclic ring systems and the rupture of glycosidic and phosphoester linkages can here bedemonstrated.

REFERENCES :

(1) WEISS, J. — *Nature*, **153**, 748, (1948).
(2) WEISS J. — *Trans. Faraday Soc.*, **43**, 314, 1947 ; *Brit. J. Radiology* Suppl. 1., p. 56, 1947.
(3) STEIN, G. and WEISS, J. — *Nature*, **161**, 650, 1948.
(4) STEIN, G. and WEISS, J. — *J. Chem. Soc.*, 3245, 1949.
(5) LOEBL, H., STEIN, G. and WEISS, J. — *J. Chem. Soc.*, 2074, 1949 ; 2704, 1950 ; 405, 1951.
(6) HABER, F. and WEISS, J. — *Proc. Roy. Soc.*, A. **147**, 332, 1934.
(7) STEIN, G. and WEISS, J. — *Nature*, **166**, 1104, 1950.
(8) KELLER, M. and WEISS, J. — *Experientia*, **6**, 379, 1950.
(9) KELLER, M. and WEISS, J. — *J. Chem. Soc.*, 2709, 1950.
(10) KELLER, M. and WEISS, J.—*J. Chem. Soc.* 24, 1951.
(11) STEIN, G., and WEISS, J. — *Nature*, **162**, 184, 1948.
(12) STEIN, G. and WEISS, J. — *J. Chem. Soc.*, 3256, 1949.
(13) TAYLOR, B., GREENSTEIN, J. P. and HOLLAENDER, A. — *Arch. Biochem.*, **16**, 19, 1948.
(14) SCHOLES, G. STEIN, G. and WEISS, J. — *Nature*, **164**, 709, 1949.
(15) SCHOLES, G. and WEISS, J. — *Nature*, **166**, 640, 1950.

DISCUSSION

M. Haïssinsky. — Je voudrais demander au Dr. WEISS s'il peut expliquer pourquoi — d'après ce qu'il me semble — il a toujours observé des réactions d'hydrogénation ? En particulier, dans les expériences sur des composés à double liaison, on pouvait s'attendre à ce qu'il y ait aussi hydrogénation. Au point de vue énergétique, je ne pense pas que celle-ci soit impossible.

Est-ce que vraiment vous n'avez pas observé d'hydrogénations et en avez-vous l'explication ?

Dr. Weiss. — We believe that in the case of benzene there has been some hydrogenation, and that was to be expected because of some of the experiments of Steacie which showed that hydrogen atoms did hydrogenate benzene. However there was too little of the hydrogenated substances in the solution, so we have not been able to isolate it. We may expect that some partly hydrogenated substances would be present, but we have not actually observed them. I think they are difficult to isolate under these conditions.

Dr. Breger. — This question of studying the number of compounds is particularly pertinent, and we too have studiedit.

In the first place, with cholesterol we found that we got

very little reaction, beyond the production of a great deal of hydrogen.

In the case of the real losses, which I hope Dr. Weiss may be able to talk about now, we obtained a rather interesting result which we have not been able to follow up owing to the lack of time.

Compressing, for instance, gave us a large amount of peroxide on decomposition, but when we examined it we found that the material smelt so strongly of burnt sugar, that we actually questioned the possibility of having found some sugar composition there.

Dr. Weiss. — There is one point, that is of considerable interest, and which I did not have time to mention. You can take for instance a 1 % solution of cholesterol, and by irradiating it one can under suitable conditions transform it to about 99 %. That is, I think, one of the most striking cases of « protection ». The activation energy in the 5,6 oxidation is apparently small compared with that of the further oxidation of the products. That has been among the most remarkable things which we have observed.

It would not be surprising, if even with very small doses, we would get something very similar just because one gets hardly any by-products under these conditions.

In the case of amino acids as I mentioned, these have been studie dalso by Dr. Dale. We have found that the products are somewhat similar to those of biological oxidations. One gets ammonia and the corresponding aldehyde.

Dr. Dainton. — One of the most pressing problems in this field is to know the relative activity of the OH on the one hand and the H on the other. Therefore, it is necessary to have independent sources, all in connection with x-gamma, or any other type of radiation ; to have independent sources of OH and H, with special distribution, with maybe authority at will, and also then to subject molecules of biological interest to these sources of H and OH.

Perhaps it is worthwile mentioning that you can produce exactly the same type of inactivation with hydrogen generated by three different methods, as you can with x-ray. You get the same type of dose curve, but if you change over, and do the same thing with a variety of hydrogen atoms in water, you get much less reactivity. Furthermore, if you alter the conditions to such that you get your hydrogens to (inaudible several words here) you get some very interesting differences, so that one can provide photo-chemical analogy of likely ionization tracks, and H and OH separately, and study some of these reactions.

In that study reactivity H is less than OH, and I should add one of the other reactions which we have studied, and which the same sort of thing seems to be engaging.

M. Grabar. — Je voulais demander au Dr. Weiss si, dans le cas des rayons X il a observé la formation de composés polymères complètement insolubles, comme nous l'avons constaté avec M. Prudhomme pour les ultra-sons. Nous avons observé la disparition complète des bandes d'absorption ultraviolettes du noyau cyclique, et je voulais aussi demander à M. Weiss, si dans le cas des réactions produites par des rayonnements ionisants, on obtient également des composés dépourvus de bandes d'absorption dans l'ultraviolet ?

Dr. Weiss. — Under our conditions we work with very small doses, because we were interested in the hydroxylation. Therefore, one should have only a very slight change, otherwise one gets secondary reactions. When we get relatively large amounts of the products we mayhave some of the other things as well. I personally think we have not enough in the solution to interfere.

Dr. Burton. — I have either read, or learnt indirectly, that you got more resources than you do.

Dr. Weiss. — I left out the phenol. If one studies phenol, one gets only quinol and catechol.

We are, as a matter of fact, studying, at the present time this matter in detail. If one carries out the experiment with a radium beryllium (source) of neutrons (which gives also a lot of gamma), one gets an opening of the benzene nucleus.

Dr. Breger. — We bombarded benzoic acid at 100 centigrades, and from that bombardment, was a highly coloured yellow substance, unsoluble, which had we, think, an molecular weight of 750 and 1,000, and which, when we attempted to analyse it chemically, gives back acejic acid.

We think, therefore, that the compound had a structure resembling a benzine wheel, a compound ring, and so forth.

ON THE MECHANISM OF INDIRECT ACTION

by F. H. KRENZ de l'Université d'Edimbourgh

It has now been generally accepted that the agents of indirect action aqueous solution are H atoms and HO radicals formed in water during the absorption of high energy radiations. The detailed mechanism by which these agents react is still, however, in some doubt, and the two principal theories which have been advanced to date differ at least on one point. The description of indirect action advanced by workers of the chemical school (2, 12, 13) is based on homogeneous kinetics. It is assumed for the purpose of theoretical treatment that the atoms and radicals have an initial distribution which is uniform sot hat an overall concentration of atoms can be assigned, and this used in the familiar way to describe the steady state with respect to the production of radicals by the radiation and their disappearance by reactions with the solute and by recombination.

The description advanced by the physical school of workers (4, 5, 9, 10, 11) considers the atoms and radicals to be formed initially in the tracks of particles moving through the solution with a wide range of energies. The linear density of the atoms and radicals is a function of the speed of the particles, increasing as the particles are slowed down. In the case of fast electrons a situation may exist early in the track where the distance between radicals is of the same order as the distance between tracks and the radicals may be said to have an approximately uniform distribution. This situation cannot hold in that region of the track where the electron is slowed down and finally stopped and where the density of ionisation approaches that of alpha particles. In the physical theory it is customary to assign a mean linear density of atoms and radicals for a given energy of incident radiation.

The results described by the chemical school have to a very large extent been obtained with gamma radiation and hard X-rays in which case the assumption of homogeneous initial distribution of radicals would seem to be justified. It should be noted, however, that even in the case of gamma rays Dainton has found a significant departure from true homogeneous kinetics (2) in the HO radical induced polymerisation of acrylic monomers. A consideration of H_2O_2 production in pure water by radiations of different specific ionisation has led Allen to propose that even in the case of fast electrons there is a region of the track (the « hot spot » at the end) where reactions between radicals occur in preference to reactions with the solute (1). If the products of these reactions (H_2 and H_2O_2) are important to the process of indirect action — and they usually are — a description of the process by homogeneous kinetics is difficult to justify.

There is one possible extenuating circumstance. If the rate of diffusion of the radicals and their products out of the primary track is large compared to the rate of reactions with the solute, they may become uniformly dispersed before appreciable reaction with the solute occurs. Homogeneous kinetics may then be a good approximation to the actual state of affairs.

The physical theory, a treatment of the mechanism by non-homogeneous kinetics, is based on Jaffe's theory of columnar ionisation (6). The theory has been modified only slightly by Lea (*) (9) to describe the fate of atoms and radicals initially concentrated with a mean linear density, N_0, near the axis of the track of a primary particle. Following Jaffe, it is assumed that the initial distribution taken up by the radicals is Gaussian and symmetrical about the axis of the track, and the concentration, n, of radicals at a distance, r, from the axis is given by :

$$n = \frac{N_0}{\pi b^2} e^{-\frac{r^2}{b^2}}.$$

The parameter b is chosen to be the initial radius of the track, and represents a considerable un certainty in the treatment, as there are no data from which it can be safely estimated in the case of water or aqueous solutions.

The general equation describing the change in

(*) The considerable modification to the theory made by Kara-Michailova and Lea (7) has not been applied to indirect action.

concentration of the radicals with time as the result of diffusion outwards from the track, [recombination of radicals and atoms] and reaction with solute molecules, and can be written (4)

$$\frac{dn}{dt} = D\Delta^2 n - \alpha n^2 - \beta cn \qquad \text{(I)}$$

Where D = The mean diffusion constant of the atoms and radicals.

α = The bimolecular velocity constant for recombination.

β = The bimolecular velocity constant for reaction with the solute.

C = The concentration of the solute.

It should be noted that this expression can be considered to treat any number of reactions leading to eventual recombination as well as any number of reactions with solutes, provided they can be represented with the general concentration, C. In the solution of I it is customary to assume (4, 6, 9, 10, 11) that the distribution of radicals remains Gaussian in spite of the fact that diffusion is not the only process occuring. This represents a fundemental weakness in the treatment, for if the recombination and reaction terms of I care comparable to the diffusion term, the assumption of a Gaussian distribution may be considerably in error. The assumption is justified (6) only by the simplification it makes possible in the solution of I, for on the assumption I is easily transformed into

$$-\frac{dN}{dt} = \frac{\alpha N^2}{2\pi(4Dt + b^2)} + \beta CN. \qquad \text{(II)}$$

Here N = The total number of radicals and atoms remaining per cm of track at time t.

and $\sqrt{4Dt + b^2}$ = The mean radius of the track at time t.

A consideration of the problem suggests that the difficulty might be removed if the rate of diffusion of radicals were large compared to both their recombination and reaction with the solute. There is, of course, no justification for such an assumption, since the diffusion constants of the radicals and atoms are not known and only relative rates of reaction with the solute can be measured. However, since the the assumption simplifies the theoretical treatment and since it represents a possible meeting point of homogeneous and non-homogeneous kinetics it appears to be worth considering in some detail. This may be done in the following way :

Integration (*) of II leads to an expression of N as a function of t and several parameters.

$$N = \frac{N_0 e^{-\frac{\beta C}{4D}(4Dt + b^2)}}{e^{-\frac{\beta C b^2}{4D}} + \frac{\alpha N_0}{8\pi D} \ln\left(\frac{4Dt + b^2}{b^2}\right) + \frac{\alpha N_0}{8\pi D} Z}. \qquad \text{(III)}$$

Here Z is a series term of the form

$$Z = -\left(\frac{\beta C}{4D}\right)(x - b^2) + \left(\frac{\beta C}{4D}\right)^2\left(\frac{x^2 - b^4}{2 \cdot 2!}\right) - \left(\frac{\beta C}{4D}\right)^3\left(\frac{x^3 - b^4}{3 \cdot 3!}\right) + \cdots x = 4Dt + b^2.$$

In expression III $\frac{\beta cb^2}{4D}$ and $\frac{\alpha N_0}{8\pi D}$ are pure numbers expressing the ratio of the rate of diffusion out of the track to the rate of reaction with the solute and the rate of recombination. By choosing different values of these ratios — without assigning values to the unknown constants — it is possible to test individually their effect upon the radical distribution. other factors being constant. In figure 1 this is

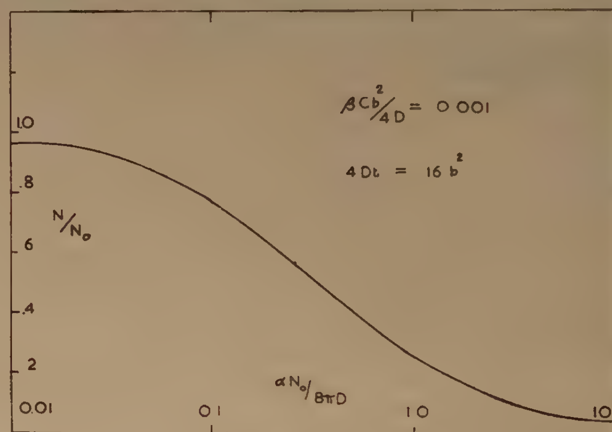


Fig. 1.

done with different values of $\frac{\alpha N_0}{8\pi D}$ for a fixed value of $\frac{\beta C b^2}{4D}$ and a fixed value of the time variable, $4Dt$, It is seen that for values of $\frac{\alpha N_0}{8\pi D}$ equal to or less than about 0,02, this variable no longer affects the radical distribution. We shall choose 0.01 as the maximum value of $\frac{\alpha N_0}{8\pi D}$ for which III is an accurate description of the distribution of radicals and atoms.

(*) I am most indebted to Mr. A.O. Stanesby of this Department for the method of solution.

In the same way we may choose $\frac{\beta C b^2}{4D} = 0.001$

These can be considered to be the maximum values for which III is an exact solution, that is, for which the assumption of Gaussian distribution is justified. It may be of interest to compare this value of $\frac{\alpha N_0}{8\pi D}$ with the value used by Lea ([9]). Lea calculates α to be $4\lambda\ 10^{-10}$ cc mol sec; to N_0 he assigns (for therapeutic X-rays) the value 6×10^5 cm; and to D he assigns 2×10^{-5} cm²/sec, which is the diffusion constant of D_2O in water. For these values $\frac{\alpha N_0}{8\pi D} = 0.48$. Reference to figure 1 shows this to be large enough to alter seriously the distribution of radicals described by expression III.

For these values of the constants the assumption of Gaussian distribution is certainly unjustified. The value for D is probably in error, for the mobility of atoms and radicals in water is likely to be considerably greater than the mobility of D_2O. Some uncertainty must also be attached to the calculation of α.

If we use the values $\frac{\alpha N_0}{8\pi D} = 0.01$ and $\frac{\beta C b^2}{4D} = 0.001$ chosen above, we may use expression III to determine the fraction of the radicals surviving at any time, N/N_0, as a function of the time variable $4Dt$ by giving to this values which are multiples of b^2. The result is shown in the upper curve of figure 2.

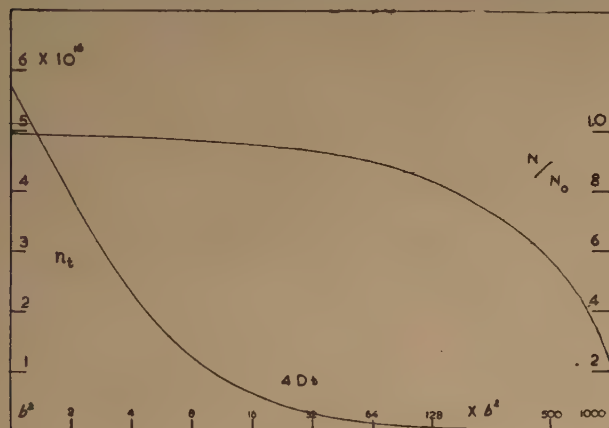


Fig. 2.

If we are prepared to assign values to N_0 and b as well, we may compute the mean concentration of atoms and radicals existing at any time. This will be the concentration at a distance $\sqrt{4Dt + b^2}$ from the axis of the track. The lower curve, n_t, of figure 2 is obtained for $N_0 = 10^6$ and $b = 10^{-6}$, which are probably correct to within an order of magnitude for a « hot spot ».

From these values of the constants N_0 and b, and from the values assigned to $\frac{\alpha N_0}{8\pi D}$ and $\frac{\beta C b^2}{4D}$ it can be calculated that

$$a \simeq 6 \times 10^{-17} \beta C.$$

If we choose as a concentration typical of indirect action $C = 6 \times 10^{17}$ molecules/cc (10^{-3} M.P.L.) so that

$$a \simeq 36 \beta$$

we may determine the relative rates of reaction and recombination throughout the history of the radicals in a given track. This is done in figure 3 in which

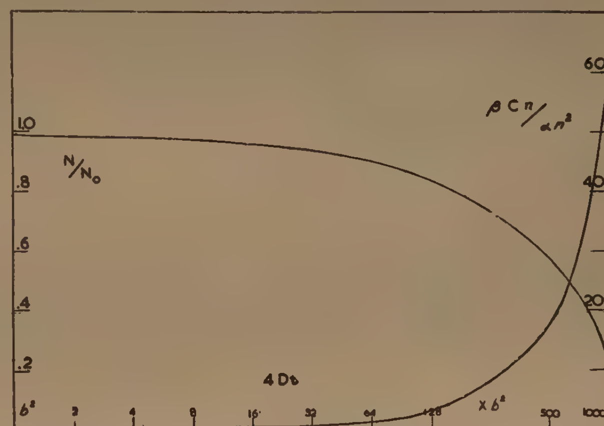


Fig. 3.

N/N_0 is repeated for the sake of comparison. It is seen that while recombination predominates early in the track, the total number of radicals which disappear by recombination is relatively small. The yield of recombination is the refore small and the yield of reaction with the solute is correspondingly large. At other concentrations of the solute — for a fixed value of α/β — the situation will be different.

It may be possible to compare this result with experimentally measured variations of the yield of indirect action with the concentration of the solute and in this way arrive at relative magnitudes of the numerous unknown constants. It should be emphasised that the method will not be applicable to reactions like the gamma-ray induced oxidation of aqueous ferrous sulfate ([8]) where the simple free radical theory does not account for the facts. It will be applicable in cases where all the reactions

taking place can be divided into the $\alpha\ n^2$ and the $\beta\ C\ n$ categories respectively.

In closing I should like to express my sincerest thanks to the Comité d'Organisation for the opportunity to discuss these ideas on this occasion.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ALLEN. — *J. Phys. Colloid. Chem.*, **42**, 479, 1948.
(2) DAINTON. — *J. Phys. Colloid Chem.*, **42**, 490, 1948.
(3) DAINTON and MILLER. — *Proc. XI Int. Cong. pure and appl. Chem.*, **11**, 11, London, 1947.
(4) DALE, DAVIES and GILBERT. — *Biochem. J.*, **45**, 93, 1949.
(5) DALE, GRAY and MEREDITH. — *Phil. Trans.*, A**242**, 33, 1949.
(6) JAFFÉ. — *Ann. Phys.*, Leipzig, **42**, 303, 1913.
(7) KARA-MICHAILOVA and LEA. — *Proc. Cam. Phil. Soc.*, **36**, 101, 1940.
(8) KRENZ and DEWHURST. — *J. Chem. Phys.*, **11**, 1337, 1950.
(9) LEA. — *Action of Radiation on Living Cells*, Cambridge, 1946.
(10) LEA. — *Brit. J. Radiology*, Suppl. n° 1, 59, 1947.
(11) READ. — *Brit. J. Radiology*, **22**, 366, 1949.
(12) WEISS. — *Nature*, **153**, 748, 1944.
(13) WEISS. — *Trans. Faraday Soc.*, **43**, 314, 1947.

DISCUSSION

M. Lefort. — Je voudrais dire que je me suis intéressé à la répartition des radicaux le long des trajectoires alpha et X. Le calcul qui a été indiqué au tableau a d'ailleurs déjà été fait par le Dr. Lea en grande partie, et je crois qu'on peut se servir de ces données uniquement de façon relative, c'est-à-dire pour comparer les rayons alpha et les rayons X, par exemple, c'est-à-dire des rayons d'intensité d'ionisation grande ou faible, mais il est beaucoup plus difficile d'avoir une valeur absolue de la répartition.

En effet, dans les équations devrait intervenir l'énergie d'activation des réactions H + OH, ou OH + OH, ou H + H, et ces énergies sont peu connues, si bien que tout ce qu'on peut calculer, ce sont les valeurs alpha ou beta d'après la théorie cinétique en solution aqueuse. Mais il est difficile d'avoir les valeurs de l'expression $\alpha e^{-E/RT}$, E étant l'énergie d'activation.

De sorte que tout ce qu'on peut faire, je crois, d'après les résultats auxquels je suis arrivé, c'est calculer et comparer des rayonnements d'ionisation de différentes densités, mais il est difficile d'avoir la valeur absolue du nombre de radicaux libres formés autour de la trajectoire.

M. Krenz. — You notice that the parameters $\alpha No/8\pi D$ and $\beta Cb^2/4D$ are pure numbers and that in putting in different values of these parameters I am not assigning definite values to the unknown constants. One may use the values of the constants chosen by Lea to make the calculations, but as I have shown, they invalidate the assumption of Gaussian distribution, and throw some doubt on the outcome of the calculation.

Dr. Gray. — if the radicals diffused away so rapidly from the track that you could really apply homogeneous kinetics to them I think it would be a consequence that α ray ionisation would be the same as that of X-radiation given at the same dose rate. This seems improbable in that the difference between alpha radiation chemistry and X-radiation chemistry is so marked. I think that in the case of ion densities of the order of those produced by alpha particles the actual kinetics in the track must be taken into consideration. The tail of your electron track approaches alpha particle conditions more and more as it slows down, roughly at about 1 KV it becomes equal. How much of the tail is alpha particle and how much of it is more sparsely ionised is rather indefinite.

I should also say that Dr. Read has shown me a short note which he is submitting to the British Journal of Radiology in which he has examined the likely validity of neglecting the recombination term in your first equation, which is, in effect, what you do if you consider only diffusion. You consider the term depending upon n^2, the recombination of the radicals, is negligible, I think.

M. Krenz. — The effect is, of course, to drop both the recombination and reaction term out of expression I in solving for the distribution of the radicals. What I have done is to determine the maximum values the parameters relative to these terms may have which still justify the assumption of Gaussian distribution.

Dr. Gray. — Read reached the conclusion that with X-radiation it was probably justifiable to neglect the recombination term, but that with alpha radiation it was not justifiable if one used more or less accepted values of the past.

Dr. Dainton. — I would like to make the following two points :

1. Eighteen months ago, Mr. Collinson working in my laboratory, investigated the isotopic content, $O^{16}O^{18}/O^{16}O^{16}$, of th oxygen evolved when hydrogen peroxide undergoes photolysis in water enriched in H_2O^{18}. It can easily be shown that if the percentage of O^{18} isotope in the evolved gas is larger than that in the solute (H_2O_2) then the reaction



$$O^{16}H + H_2O^{18} \rightleftarrows H_2O^{16} + O^{18}H \qquad (1)$$

must have occurred. The results of this study indicated that this equilibrium was not unusually mobile and that the rate constant at 25°C is that which is to be expected of a normal radical replacement reaction. The relevance of this result to Dr. Krenz' calculations is just this : if Grotthuss-type diffusion of OH radicals occurs in water then reaction (1) would have appeared to be extremely mobile. Conversely, since reaction (1) is not unduly mobile, Grotthuss-type diffusion of OH radicals does not occur in water and the true diffusion constant of these radicals is unlikely to be far different from that used by Dr. Krenz.

2. My second point is a general observation concerning the meaning of the terms homogeneous and heterogeneous as applied to the kinetics of radiochemically induced reactions. At dose rates sufficiently high to ensure that the mean distance between radicals in a given track is not less than the mean distance of separation of the tracks, the primary acts may be considered to occur at the same rate uniformly throughout the system. The chance of collision of radicals from different tracks is then as high as the chance of collision of radicals from the same track. This is a truly *homogeneous* situation. At low dose rates the mean separation of radicals within the tracks is much less than the separation of the tracks themselves and reactions of radicals in pairs will take place almost exclusively within individual tracks and scarcely at all in the intervening space between tracks. This is the heterogeneous situation. It is clear that the use of interrupted radiation as envisaged by Professor Burton and others will only yield useful data when the homogeneous condition is satisfied. Only then will there be a variation of yield with frequency of intermission of the radiation. It is, of course, possible to use a solute which reacts with the radicals which are produced in the primary act to form other radicals which do not react in pairs so rapidly

as the original radicals. Such longer lived radicals which are formed within a track will diffuse over greater distances and will have an enhanced chance of interacting with similar radicals from different tracks. An example of this now being investigated by Mr. Rowbottom is the radiolysis of dilute solutions of hydrogen peroxide in which the radicals HO and H, by reaction with H_2O_2 rapidly form HO_2 radicals which are long lived and undergo slow mutual distruction (see also my reply to Dr. Magat).

Dr. Gray. — An α-particle can never be made equivalent to any dose rate of X-radiation.

Dr. Dainton. — I agree, but logically, very low dose rates of X-rays should be « tracklike » and very high dose rates of α's would be homogeneous. We have experimental evidence for the former but none for the latter.

Dr. Gray. — It goes quite differently from ordinary dose .....away with you pretty quickly, and what we are doing now is studying interrupted radiation, micro-second duration, and perhaps just judging by the average time required by a graduated constant to proceed to a conception of a constant, and to reach a conclusion that I will be able to tell you something about. We are starting something like that regarding homogenous and non-homogenous distribution of these particles.

THE ANALOGY BETWEEN THE CHEMICAL ACTION OF IONISING RADIATION AND THAT OF ULTRASONICS ON AQUEOUS SOLUTIONS

by N. MILLER, de l'Université d'Edimbourg

It has been known for many years that aqueous solutions containing dissolved oxygen, when irradiated with sound waves of such intensity that cavitation is produced, show chemical changes very similar to those induced by ionising radiation. To help in interpreting these chemical effects it is desirable to carry out careful kinetic studies of certain characteristic reactions, such as the oxidation of potassium iodide and of ferrous ions in aqueous solution.

The writer has carried out a number of experiments on the kinetics of the oxidation of ferrous ions in air-saturated 1N. sulphuric acid solution by about 3 watts of 500 kc. sound (1). Solutions of this type are known to show very reproducible behaviour on irradiation with X-and γ-rays, the oxidation proceeding linearly until all the ferrous ions are converted (2). Moreover there are wide regions in which the observed yield is independent of the initial ferrous concentration and of the intensity of the X- or γ-radiation. These desirable features are not evident in the kinetics of the oxidation of potassium iodide solutions by similar radiation (3), and the interpretation of the results obtained is therefore much more difficult in this case.

In order to obtain reproducible results with ultrasonics it proved to be essential to maintain the irradiation cell in a fixed position with respect to the source of the sound. Irradiations could not be carried out in a closed system, as chemical changes were only observed when dissolved gases were present, which were expelled on irradiation : the surface had therefore to be free, but the statistical variations in energy absorption due to fluctuations in the surface could be minimised by using a long thin cell with a narrow neck.

The oxidation of solutions of concentration greater than 5×10^{-4}M. in ferrous ions was found to be linear with time within the first few minutes of irradiation (fig. 1), and the slope of this line provided an index of the « yield » of the reaction per unit input of energy. A set of similar experiments was next conducted, in which the initial Fe^{2+} concentration of the solution was varied. A plot of the initial yield against the initial ferrous ion concentration revealed that when the initial concentration was below 5×10^{-4}M. the yield was reduced, and the graph appeared quite analogous to similar plots obtained using ionising radiation (figs. 2 and 3) (4). It is interesting to compare these results with those obtained by Nurnberger (5) for the irradiation of similar solutions with α-rays, where no region of concentration independence was observed. From this comparison we can imply that the distribution of active radicals produced by ultrasonic radiation resembles that produced by γ-rays more closely than that produced by α-rays. Much more information on the α-irradiation of dilute ferrous solutions is, however, needed before a valid comparison can be drawn, and data of this type are at present being obtained in the writer's laboratories.

There was no measurable change in the yield when the sound intensity was changed 3-fold (fig. 4), or when the solution was initially saturated with pure oxygen. Saturation with hydrogen suppressed the reaction completely, as also did heating of the solution to 55°C., while initial saturation of the solution with cylinder nitrogen reduced the yield by a factor of ten.

These results are consistent with the electrical theory of Frenkel (6) for the chemical action of ultrasonics, but on the basis of the evidence available at present the « mechano-chemical » theory of Marboe (7) cannot be ruled out. The evidence for an « indirect » mechanism involving first a disruption of water-molecules into H atoms and OH radicals is very strong.

REFERENCES

(1) Miller. — *Trans. Faraday Soc.*, **46**, 331, 1950.
(2) Fricke and Morse. — *Phil. Mag.*, **7**, 129, 1929.
Miller. — *J. Chem. Phys.* **18**, 79 (1950).

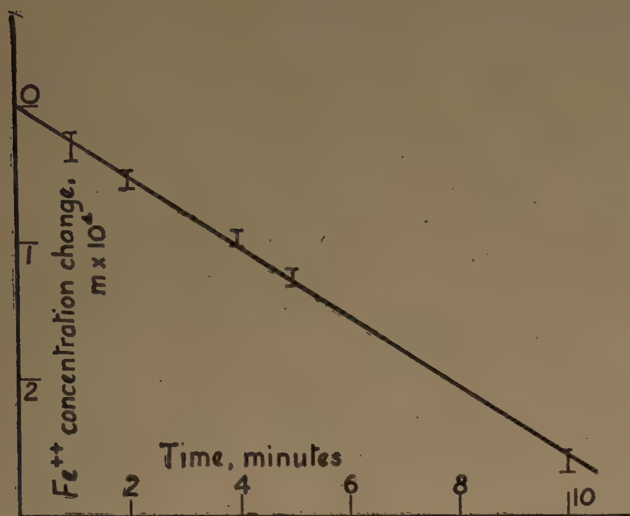


Fig. 1. — Air-saturated solutions — Fe^{2+} concentration change against irradiation time at constant intensity of sound. Initial Fe^{2+} concentration = 10^{-3}M.

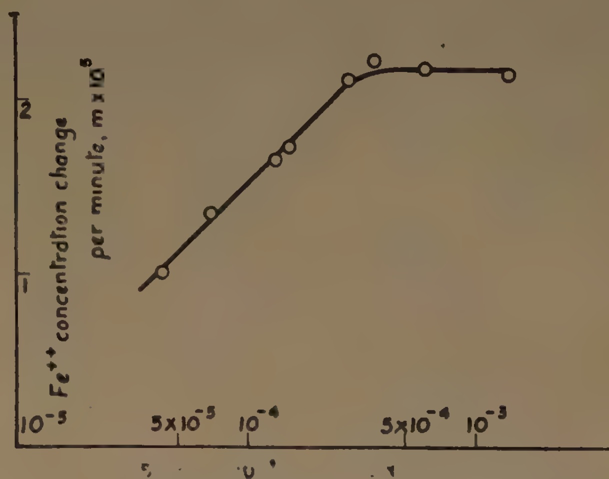


Fig. 2. — Air-saturated solutions — rate of Fe^{2+} concentration change against initial Fe^{2+} concentration at constant intensity of sound.

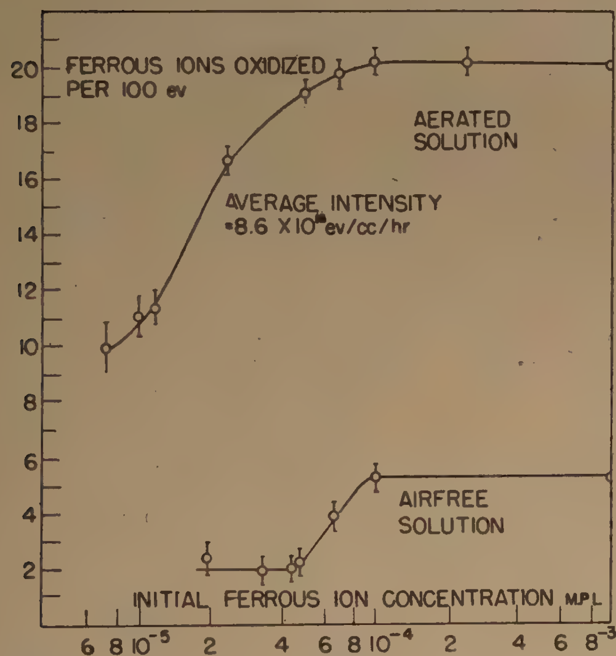


Fig. 3. — Yield of Fe^{2+} oxidation by γ-radiation as a function of the initial Fe^{2+} concentration in aerated and airfree solutions. (Reproduced by courtesy of Messrs. Krenz and Dewhurst[4].)

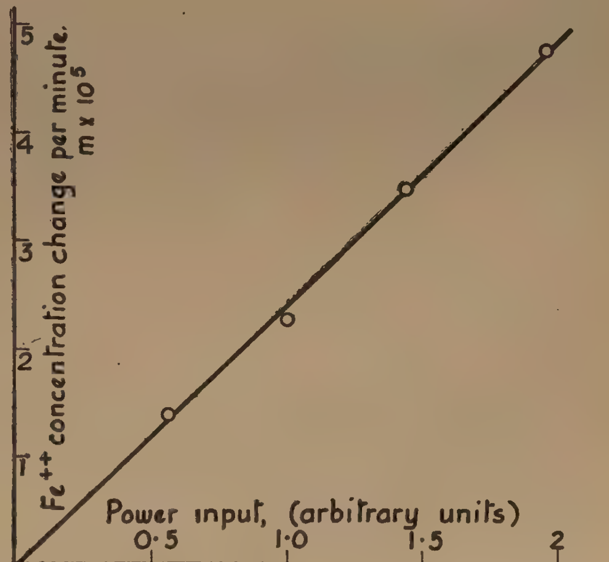


Fig. 4. — Air-saturated solutions — rate of Fe^{2+} concentration change against intensity. Initial Fe^{2+} concentration in each case = 10^{-3}M.

(3) Clark and Pickett. — *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 645, 1930 ; Haissinsky and Lefort. — *Comptes rendus*, **228**, 314, 1949.
(4) Krenz and Dewhurst. — *J. Chem. Phys.*, **17**, 1337, 1949.
(5) Nurnberger. — *J. Phys. Chem.*, **38**, 47, 1934.
(6) Frenkel. — *Acta physicochim.*, **12**, 317, 1940.
(7) Marboe. — *Chem. Eng. News*, **27**, 2198, 1949.

DISCUSSION

Dr. Haïssinsky. — Si j'ai bien compris, d'après le Dr. Miller, les actions des ultrasons sont analogues à celles des rayons X, en se basant sur la courbe de la variation du rendement, en fonction de la concentration. Je crois que cette analogie n'est pas suffisante parce que, d'après les expériences de Lefort, on a des courbes analogues aussi avec les rayons alpha.

Avec M. Prudhomme nous avons dressé une liste d'analogies et de différences entre les actions des ultrasons et des rayons X d'une part, et des rayons alpha d'autre part, et elle montre que l'analogie est plutôt plus grande entre les alphas et les ultrasons.

Voici les résultats les plus remarquables :

L'eau oxygénée (en l'absence d'oxygène) se produit sous l'action des ultrasons et des rayons α, mais elle n'a pas lieu sous l'action des rayons X.

Par contre, la décomposition de l'eau oxygénée se fait sous l'action des rayons X, elle est extrêmement lente pour les α, d'après les expériences de Lefort, et nulle pour les ultrasons, d'après les expériences de Grabar et Prudhomme.

La réduction de l'oxygène pour former de l'eau oxygénée se produit avec les rayons X, elle ne se produit ni avec les α ni avec les ultrasons.

Les oxydations se font facilement avec les trois types de radiations ; par contre, les réductions sont très faciles avec les X, plus difficiles avec les α et très rares dans le cas des ultrasons. Les seuls cas où on les a observées jusqu'ici sont les sels cériques et le permanganate.

Enfin, la réduction de l'iode se fait par les rayons X, mais elle ne se fait par les ultrasons ni par les rayons α.

Il faut par conséquent chercher un mécanisme de distributions des radicaux libres dans le cas des ultrasons, analogue à celui des α. Je suis d'accord avec le Dr. Miller, qu'on doit partir de la théorie de Frenkel, mais cet auteur avait envisagé un effet photochimique. Il semble plutôt qu'on doit retenir des décharges très localisées. On aurait alors, une distribution de radicaux analogue à celle qui se produit avec les rayons alpha. Les actions différentes des radicaux H et OH s'expliqueraient qualitativement comme dans le cas des rayons α.

M. Prudhomme. — Les décharges sont, en effet, extrêmement localisées.

Dr Gueron. — How do the temperature effects observed with X-and γ-radiation compare with those of ultrasonics ?

Dr. Miller. — The temperature effects observed with this type of radiation are small. Minder and his co-workers in Switzerland observed no effect of temperature on yield between 0 and 50°C ([8]), while more recently Krenz and Dewhurst ([9]) observed a very slight dependence up to 60°C.

Dr. Grabar. — I think that the question of the temperature coefficient in ultrasonics is quite difficult to establish. The solubility of the gas phase in the water is important, and much affected by temperature. We have seen that when we irradiate potassium iodide solutions in higher concentrations the yield is eventually determined by the solubility of gas in the solution. I would like to ask Dr. Miller if he has made corresponding measurements of the solubility of gas in his solutions.

Dr. Miller. — I read of course of Dr. Grabar's experiments on potassium iodide, but it was once evident to me that the concentrations of potassium iodide which he was using were very high — up to 50 % KI — and that the effect he describes did not become marked until a concentration of 5 % KI was reached. In my case the highest concentration of ferrous ion used was a little over one-thousandth molar, and the effect of such small concentrations of salt on the solubility of air in 1N. sulphuric acid could obviously be neglected.

RÉFÉRENCES

(8) Minder and Liechti. — *Experientia*, **2**, 410, 1946.
(9) Krenz and Dewhurst. — Private communication.

SOME ASPECTS OF THE BIOCHEMICAL EFFECTS OF IONISING RADIATIONS

W. M. DALE, M. D., D. Sc.
Christie Hospital and Holt Radium Institute. Manchester

When I had the great privilege of being invited by your Committee to contribute to this meeting on this celebrated occasion, I was wondering whether I should give you a sort of general outline of the work of my laboratory or whether I should rather choose a more controversial issue which would show that we have not yet reached the stage of a full understanding of the effect of ionising radiations. I have decided to do the latter because I thought it might provide a further stimulus to press on with research .

I propose to deal with some aspects of the deamination of amino acids by X-rays and with recent experimental results on sulphur containing amino acids. (1) As is well known, one of the characteristic features of the indirect action of ionising radiation is the constancy of the ionic yield over a wide range of concentrations of the solute (Fig. 1). Only in

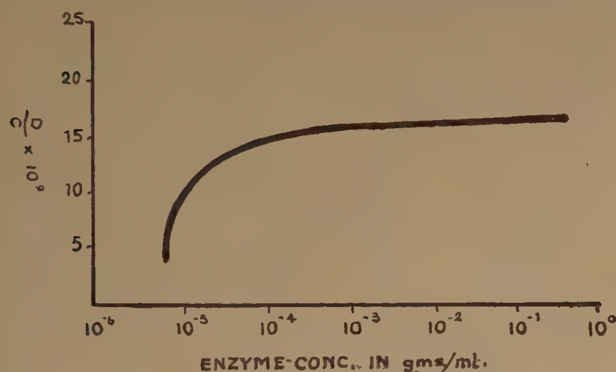


Fig. 1.

very dilute solutions a falling off of the ionic yield is observed, generally attributed to the speedy recombination for radicals. When the concentration of the solute increases, the competition of the solute molecules radicals becomes more and more successful until recombination is overcome completely and constancy of the ionic yield is reached. The deamination of amino acids, however, follows a somewhat different course (Fig. 2). Here we have a continuous rise over a wide range of concentrations and this appears to be not an isolated experience. More and more reactions of this or a similar type are becoming known. I mention among small molecules the liberation of sulphur from thiourea, and trypsin as an interesting example of a molecule of similar size as carboxypeptidase. Dr. Macdonald in Cold Spring Harbor allowed me to refer to her at present unpu-

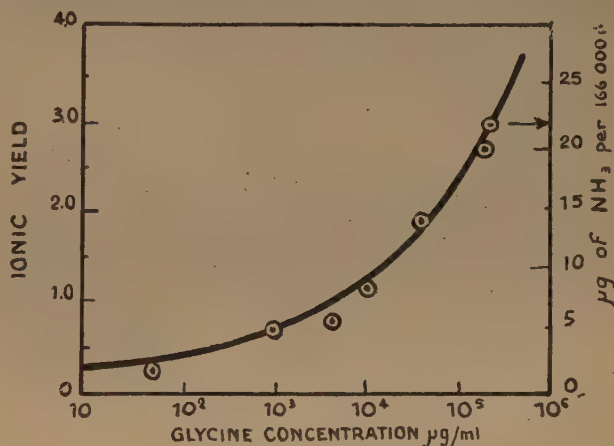


Fig. 2.

blished experiment (2) on this enzyme. She found up to concentrations of the order of about 1 % — which was the highest concentration she could attain for technical reasons — a continuous rise of the ionic yield curve in contrast to the curve for carboxypeptidase shown on the first slide, where the attainment of a constant ionic yield occurred at a much lower concentration. I draw your attention to the fact that in figure 1, as well as in figure 2, the abscissa is the logarithm of the concentration, and the ordinate the ionic yield. If the results are plotted in a different way, the abscissa directly representing the concentration, an apparent constancy of the ionic yield is reached, but the points at the lower concentrations are so condensed that a blurring of the difference

between the ordinary course of the ionic yield curve and the curve of the deamination reaction occurs. To demonstrate the essential point one has to choose a semi-logarithmic plot.

One would argue then that the continuous rise of the ionic yield curve to a relatively high ionic yield would indicate an amino acid to be a bad competitor for radicals in the sense that the recombination of radicals goes on in preference to reaction with the amino acid over a much extended range of concentrations as compared with, for example, carboxypeptidase. This explanation is consistent with experimental evidence as long as it is considered on its own. If we, however, take into account that thiourea is a particularly good acceptor of radicals, as concluded from experiments in which this substance was added as a second acceptor to an indicator substance — e. g. carboxypeptidase, and if we add the fact that the liberation of sulphur from thiourea follows a course similar to the deamination of glycine, reaching an ionic yield of about 3, we are led to a discrepancy as yet unsolved, which shows that our present interpretations of the radiation effects is not complete and that they may need modification.

The deamination is interesting also from another point of wiew. There is no difference in O_2 free and oxygenated solution. In spite of that the ionic yield for indirect action reaches a level of nearly 3 for glycine at a 20 % solution and of 4.2 for *d-l*-serine already at a 5 % concentration. That this rise of the ionic yield with concentration does not go on indefinitely can be demonstrated (Fig. 3) with *l*-serine, ([3])

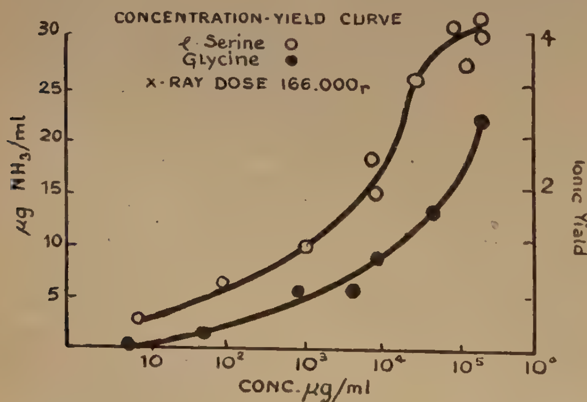


Fig. 3.

which has a considerably greater solubility than *d-l*-serine. Here we find that at the highest concentration technically possible the ionic yield curve starts to bend over, indicating a slower rate of rise with increasing concentration. Whereas it was at one time assumed] that one ionisation corresponded to the formation of one pair of radicals, one has gone over to consider the creation of radicals by excitation as well as ionisations.

As shown by Dainton and Miller ([4]), for every ionisation one might expect the formation of three radical pairs. Thus the ionic yield of 3 can be explained in terms of OH radicals. However, for *d-l*-serine and *l*-serine one has to assume either a chain reaction or the utilisation of OH and H radicals. Both Neither of these alternatives is yet sufficiently proved experimentally.

I turn now to my second item which is a short presentation of some of our more recent experiments on sulphur containing amino acids an peptides. We have found that X-radiation splits off H_2S from cysteine and glutathione. Apart from possible toxic effects of H_2S liberated within cells, these results are of signifiance in view of the role attributed to the oxidation of thiol groups in glutathione and protein for the inactiviation of SH enzymes. It could be shown in particular that the radiation effect does not consist solely of an oxidation of SH groups to disulphides and it became also apparent that H_2S is produced in preference to deamination in the case of cysteine.

Cysteine hydrochloride. Dependence of H_2S formation on X-ray dose. — The production of H_2S (Fig. 4)

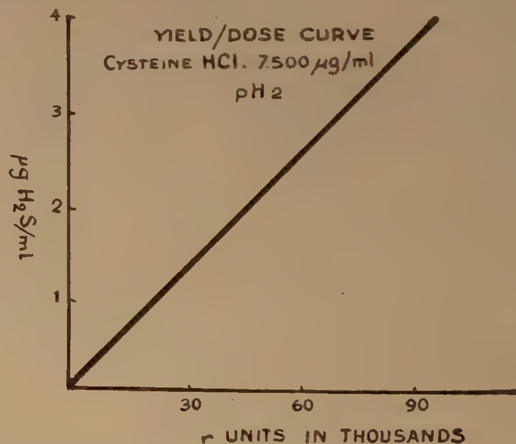


Fig. 4.

for any one concentration of cysteine hydrochloride is directly proportional to the dose up to 100,000 *r* (See. Fig. 1) wich was the highest dose applied.

Effect of O_2 an dof H_2O_2. — Solutions saturated with ai ryield the same amount of H_2S as those which

have been highly evacuated ; the process therefore seems to be independent of the oxygen content of the solution.

Solutions of cysteine hydrochloride were made containing H_2O_2 in such concentrations as would be produced by the X-ray dose used (Bonet-Maury and Lefort, 1948) (5). Less than 2 % of the H_2S yield was obtained in an equivalent time and even ten times the expected H_2O_2 concentration produced only onefifth the yield produced by irradiation.

Effect of concentration of cysteine HCl. — The yield of H_2S for a given dose rises with increasing concentration of cysteine hydrochloride solution (fig. 5) in a way that is similar to, but not identical

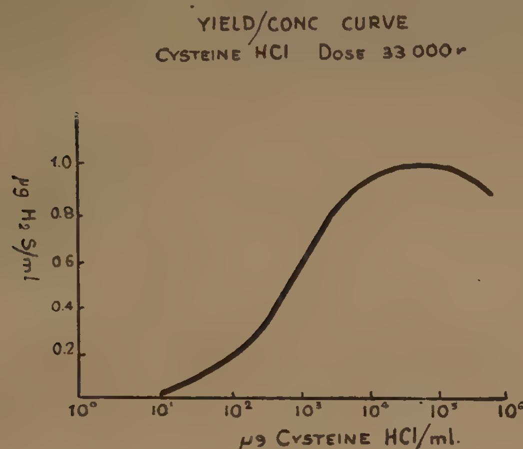


Fig. 5.

with, the production of NH_3 from glycine and serine, a flat maximum yield being obtained in the concentration region 1-20 % (See fig. 2). Cysteine hydrochloride is extremely soluble, and solutions of very high concentrations (maximum 51·8 % at 18°C.) showed a pronounced falling off in the H_2S yield. The curve shows the total yield from direct as well as indirect effect of radiation. The efficiency of H_2S production is, in general, less than that of NH_3 formation from amino acids. The maximum ionic yield obtained in the concentration region 1-20 % is approximately 0·3.

Effect of pH. — The production of H_2S from cysteine by X-radiation is pH dependent as shown in figure 6, with a maximum at about pH5.

At the time of an earlier communication of Dale et al (6) on NH_3 production by X-rays from a wide variety amino acids, etc., an effect of pH was noted and this was confirmed by Stein and Weiss (1949) (7). In particular it was observed that the NH_3 yield from cysteine HCl. at pH2, was nil or very small with doses of the order of 0_5r. It was therefore important to know whether deamination follows the same course as liberation of H_2S over an extended range of pH. The result is that at pH2, 4 and 6, no NH_3 is produced, whereas the H_2S production rises to a maximum at about pH 6.5.

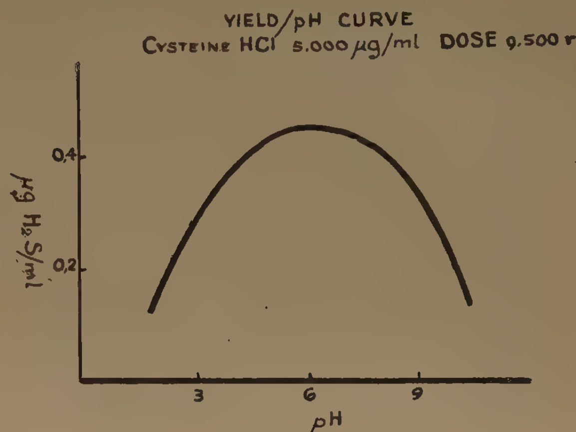


Fig. 6.

Cystine. — The oxidised form of cysteine, namely cystine, does not yield any H_2S.

Glutathione. — We have found that this biologically important tripeptide also yields H_2S on irradiation, as might be expected on account of its relation to cysteine. For a solution containing 9,500 μg/ml. of glutathione the ionic yield is about 0·25, i. e. almost the same as that for an equimolar solution of cysteine HCl. (5,000 μg/ml.) at pH2. Figure 7

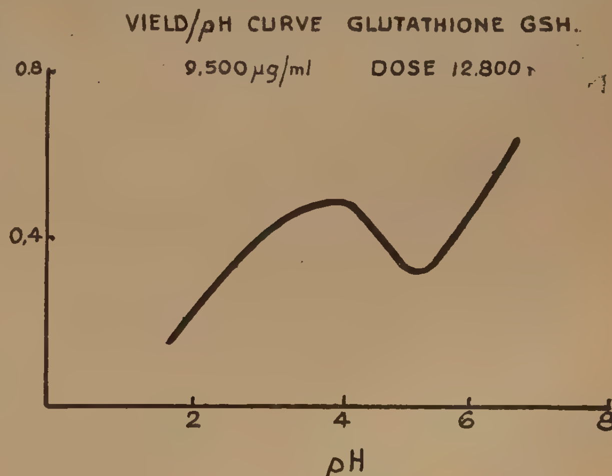


Fig. 7.

shows the relationship between H_2S liberation by X-rays and pH for reduced glutathione. In general

the yield of H_2S rises in the range pH2 to pH 6-5, although an unexpected depression in yield is observed at about pH 5.5.

The oxidised form of glutathione, G.SS.G. in the same molar concentrations and treated with similar X-rays doses showed no liberation of H_2S, again showing analogous behaviour to the cysteine-cystine system.

RÉFÉRENCES

(1) Dale and Davies. — *Biochem., J.* **48**, 129, 1951.
(2) Mc Donald. — *Ann. Rep. Depart. Genetier, Carnegie Institution of Washington*, Cold Pyring, Harbor, N. Y. (1949-50)
(3) Dale and Davies. — *Nature*, **166**, 1121, (1950)
(4) Daintoux Miller, — *Proc. Intern. Congr. and Appl. Chem.*, **11**, 77, (1947)
(5) Bonet-Mauroy and Lefort. — *Nature*, **167**, 381, (1948).
(6) Dale, Davies and Gilbert. — *Biochem. J.* **45**, 93, (1949).
(7) Stein and Weiss. — *J. Chem. Soc.*, 1949, p. 3256.

DISCUSSION

Dr. Weiss. — I certainly agree with Dr. Dale that we are very far from a full understanding. We have not investigated any of the sulphur containing amino acid, but more recently we have investigated also, phenyl alanine . I think that there can be no doubt now, from our experiments, that hydrogen can actually act as a de aminating agent. There has now been some other evidence also, namely, that, for instance, certain bacteria can activate molecular hydrogen. and that in this way ammonia is produced from aminoacids,

Dr. Dale has, already, reported that we have found very similar pH effects, and of course, also those maxima and minima. We have suggested tentatively, that this is due to the various ionic forms of the amino-acids which we know exist in these solutions, and our preliminary experiments, seem to confirm this supposition.

Dr. Dale. — I would say that I did not say that H atoms are excluded from the reaction, but that, even taking into account H and OH, it is not sufficient to explain the ionic yields.

EFFECTS OF BETA RADIATION ON THE GASTRIC MUCOSA OF DOGS

By D. M. DOUGLAS, W. R. GHENT and S. ROWLANDS
University of Edinburgh, Scotland

An essential part of treatment for duodenal ulceration is believed to be a permanent reduction in the acidity of the gastric juice, but existing methods of achieving this are either inconvenient or hazardous to the patient. Dieting must be continued for a long time, surgery involves an appreciable risk, while in the external application of X-rays organs other than the stomach cannot be protected from the penetrating radiations. We have succeeded in reducing the gastric acidity of dogs by direct irradiation of the walls of the stomach with beta rays. These penetrate no more than a few millimeters through tissue and therefore affect only the stomach mucosa. The results are encouraging but the technique will need some further development before it can be used in the treatment of human beings.

The idea of using ionising radiations to reduce acid secretion is not new. As early as 1912, Regaud, Nogier and Lacassagne studied lesions produced in a dog's stomach by X-rays. They observed a great increase in fibrous tissue and a corresponding decrease in the number of acid secreting cells. In 1924 Ivy, McCarthy and Orndoff stated that achlorhydria could be produced by rœntgen irradiation of the abdomen, and in the same year Bensaude, Solomon and Oury suggested radiotherapy for non-neoplastic ulceration of the stomach and duodenum. This form of treatment does not seem to have been tried on a large scale until 1937 when Palmer and Templeton (1939) began their observations. By 1948 Ricketts *et al.* were able to quote 800 cases of gastric ulcer treated by X-rays and their results seem satisfactory. Jenkins and McGeorge (1942) irradiated a few cases with an intragastric radium source and reported good results. However, these methods have a serious disadvantage. With the external application of X-rays it is difficult to arrange for the dose to be uniform over the gastric mucosa and some irradiation of surrounding organs is inevitable. With the intragastric radium source dosage is more even but other organs are still irradiated. In general it is most undesirable to give a massive dose of penetrating radiation to what is essentially a benign condition. With this in mind, we have applied beta rays directly to the mucous membrane of the stomach.

The source of radiation was Phosphorus 32, a pure beta emitter, now available in large quantities. The rays have a maximum penetration of about 8 mm. in tissue, but most of their energy is dissipated in the first 3 mm. of their range. By applying a source of P^{32} intragastrically, the surrounding structures are not irradiated and the greatest dose is delivered to the secretory area of the gastric mucosa. The experiments were carried out in dogs which, prior to irradiation, were trained to submit to gastric intubation. In this way the acid levels in the dogs' stomachs were determined before and after exposure.

Applicators. — In all our experiments the applicators have been inflatable balloons, impregnated with radiophosphorus. In making a satisfactory assembly, five criteria need to be met:

(1) That the radioactivity is uniformly distributed.
(2) That the activity of the balloon is known.
(3) That the balloon is pliable and distensible.
(4) That the exposure of the operator is negligible.
(5) That the radioactivity will not be ingested by the animal should the balloon burst inside.

Difficulties have been met in satisfying these criteria, and a brief account of the techniques tried might be useful to other workers.

First Method. — One hundred millicuries of carrier-free P^{32} at pH7 were added to 1 c.c. of 60 per cent. watery latex. The mixture was painted evenly on a thin-walled balloon stretched over a large test tube. This was rotated in a stream of warm air until dry, when it was vulcanised, removed from the test tube and turned inside out. Two protective balloons were added, one inside and one outside the original. Finally the three balloons were firmly cemented to a standard stomach tube. All these operations were done inside a perspex box through

armholes fitted with leaded gloves. The perspex stopped all the beta rays but there was some penetration through the gloves. This method satisfied only the criteria of known activity and distensibility of the balloon. It is difficult to ensure even distribution of the radioactivity, the exposure of the operator's hands is long, and if the balloon bursts inside the stomach, large quantities of P^{32} may be released by the gastric juice. The P^{32} which is in the form of phosphate would be readily absorbed by the gastro-intestinal tract, and in the amount used in this experiment it could cause severe aplastic anaemia.

Second Method. — The deposition of a layer of latex containing P^{32} on the inside of a balloon by centrifugal force in a spinning tube was tried. Unfortunately the vibration and rapid mixing caused coagulation of the latex which resulted in an uneven layer.

Third Method. — Radioactive red phosphorus, mixed with benzene rubber solution and an emulsifying agent, was poured between two balloons, one inside the other. The inner balloon, previously cemented to a stomach tube, was gently inflated, forcing the mixture into a thin, fairly uniform layer between the balloons. The assembly was allowed to dry for twenty-four hours when a third protective balloon was added. Finally the necks of all the balloons were cemented to the stomach tube. With this method the disadvantage of unequal distribution of the radioactivity is still present, but otherwise all the criteria are satisfied. Since red phosphorus is insoluble, a burst balloon is not a serious hazard. The time taken in manipulating the assembly is quite short, so the exposure of the operator is small.

Fourth Method. — This is an electroplating process whereby both phosphate ions and latex particles, being negatively charged, are deposited together on the anode of an electrolytic cell, the electrode being constructed in the shape of the desired balloon. This method is still in the experimental stage, but if it can be developed satisfactorily it will satisfy all the criteria. The P^{32} will be incorporated in the rubber, it will be uniformly distributed and the whole process can be carried out by remote control.

Experimental Procedure. — The dog is anaesthetised, the balloon inserted into the stomach and the position of the balloon is checked by screening. It is then gently inflated until it is judged to fill completely the stomach and fundus and to have flattened out the rugae.

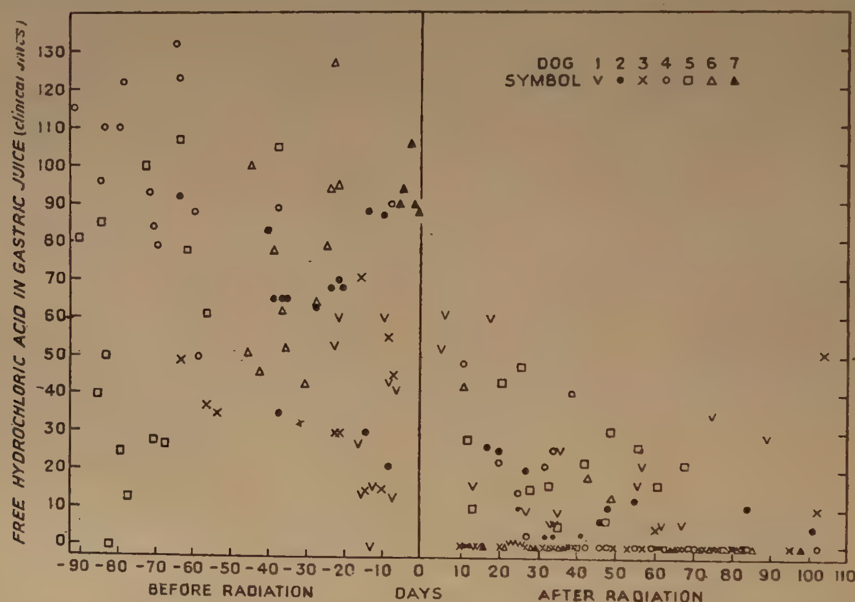


Fig. 1. — Scatter diagram showing the effect of beta-radiation of the stomachs of all the animals. (Fig. 3 from « The Production of Hypochlorhydria by Betaradiation of the Stomach » by D. M. Douglas, W. R. Ghent and S. Rowlands, *The Lancet* (1951), **1**, 492).

Periodically the balloon is deflated and rotated through 45 degrees to ensure a more even dosage. Following exposure, the levels of gastric acidity are again determined and at intervals biopsies are taken from the stomach wall. The dogs do not receive any special diet.

Dosage. — In the initial experiments reported here



Fig. 2. — Sections from the gastric mucosa of Dog 1 after radiation : (*a*) 39 days, (*b*) 140 days, (*c*) 204 days. (Fig. 4 from above paper).

the balloon containing a known activity was inflated with a known volume of fluid. A rough estimate of the surface area of the balloon was made and the dosage rate calculated. The exposure was then continued until the mucosa had absorbed energy equivalent to 5,000 roentgens. This is almost certainly more radiation than is necessary, and we believe that a reduction of acid secretion is possible without all the anatomical disturbance shown in the sections (Fig. 2). We are therefore attempting to measure dosage more accurately and to correlate it with reduction of acidity and histological change. For the present we can report only the effect of about 5,000 roentgens of beta rays on six dogs. One dog has been studied for eignt months, the others for about four months.

Results. — Following irradiation, all the dogs show a reduction in both free acid and total acid. The composite scatter diagram (Fig. 1) shows the extent of the hypochlorhydria in all the animals. All showed a loss of weight, but at the end of some months this appears to have been stabilised. Otherwise they appear quite healthy. The animals all showed atrophy of the tubular glands of the stomach, though in different degrees. Biopsies were taken from Dog 1 at 39, 140 and 204 days after irradiation (Fig. 2, *a*, *b*, *c*). The first section (39 days) shows extreme atrophy of the secretory epithelium with fibrous tissue replacement. In the second section taken at 140 days a striking change is to be seen. The fibrous tissue has been replaced by masses of large faintly staining oxyntic cells but not arranged in glandular pattern. The third section was taken at 204 days. The signs of regeneration are now more marked, the arrangement of the cells is beginning to approach normal, but judged by the secretion studied the cells are not yet producing acid.

Figure 3 shows the changes in both the total epithelial cell count and the oxyntic cell count. Normally the ratio of oxyntic to all epithelial cells is about 1 : 5. After 39 days almost all the epithelium has been destroyed, at 140 days the ratio is much higher than usual, while at 204 days the ratio is nearly back to normal again.

Dangers of the Technique. — Before the method can be applied to human beings, it will be necessary to avoid any possibility of overdosage. Excessive irradiation will cause necrosis with sloughing of the mucous membrane and subsequent fibrous tissue scarring. Accurate dosage control will eliminate this danger. In addition the possibility of late carcinogenesis cannot yet be ruled out, though available

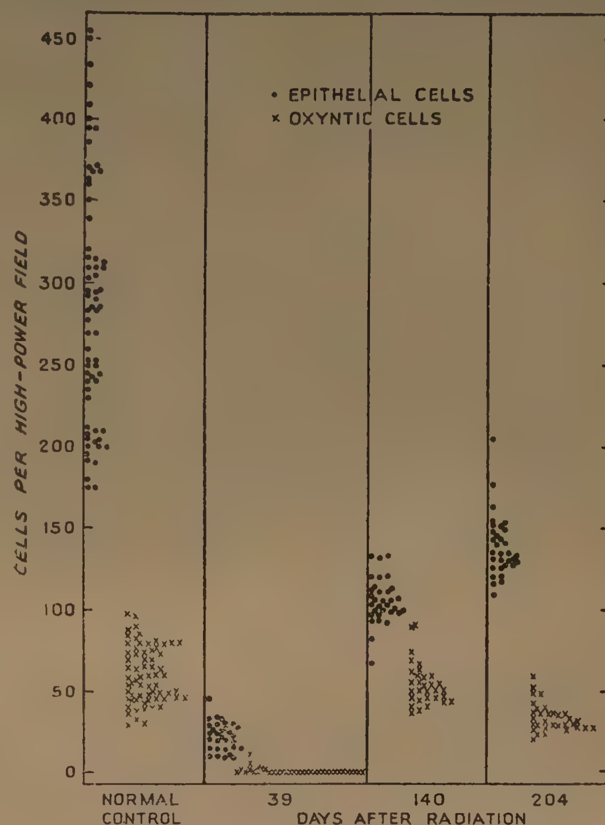


Fig. 5—Epithelial-cell counts per high-power field (× 600) of gastric mucosa of dog I

Fig. 3. — Epithelial cell counts per high power field (X 600) of gastric mucosa of Dog 1. (Fig. 5 from above paper.)

evidence (Rolleston, 1931) suggests that prolonged exposure over month or years is essential to its development.

REFERENCES

Bensaude, Solomon and Oury (1924). — *Comptes Rendus Soc. de Biol.*, **91**, 1364.

Ivy, A. C., McCarthy, J. E. and Orndoff, B. H. (1924). — *J. Amer. med. Ass.*, **83**, 1977.

Jenkins, J. A. and McGeorge, M. (1942). — *Arch. Int. Med.*, **70**, 714.

McGeorge, M. (1950). — *Quart. J. Med.*, **43**, 111.

Palmer, W. L. and Templeton, F. E. (1939). — *J. Amer. med. Ass.*, **112**, 1429.

Regaud, Nogier and Lacassagne (1912). — *Arch. d'Elect. Med.*, **20**, 2.

Ricketts, W. E., Palmer W. L. Kirsner, J. B. and Hamann, A. (1948). — *Gastroenterology*, **11**, 789.

Rolleston, H. (1931). — *Quart. J. Med.*, **24**, 101.

ÉTUDE DE LA RESTAURATION APRÈS IRRADIATION PAR RAYONS X

Par le Professeur Paul LAMARQUE
Directeur du Centre Régional contre le cancer, Montpellier.

RÉSUMÉ

L'auteur après avoir montré que le terme « Restauration » en radiobiologie méritait d'être mieux précisé rapporte une série de résultats obtenus en se servant comme objet biologique des œufs de bombyx Mori (vers à soie). Il montre que la courbe de survivance a une allure sigmoïde lorsque l'effet observé est la non-éclosion ; il insiste sur la fidélité des résultats. Il démontre l'existence d'une restauration en utilisant les méthodes d'irradiation fractionnée. Il souligne le rôle de l'activité métabolique de la cellule dans la restauration. Il apporte un procédé de mesure de la vitesse de restauration.

Il montre enfin que la restauration se manifeste le mieux dans le cas de doses partielles à un intervalle de huit heures, lorsque le rapport 1re dose partielle sur dose totale est égal environ à 2/3.

Ce sont les auteurs Anglo-saxons qui paraissent avoir été les premiers à utiliser le mot « Recovery » en radiobiologie, et nous pensons personnellement avoir été le premier à introduire en France le mot « Restauration » qui nous a paru être sa meilleure traduction.

Dans son sens le plus général, la restauration se se rapporte à la propriété que présente la matière vivante de réparer les dommages qui lui sont faits. Elle peut donc s'appliquer à des êtres complexes si l'on envisage le retour à la normale après une maladie ou une blessure et la succession des phénomènes qui s'échelonnent pendant la période de convalescence ou de cicatrisation. Mais elle peut s'appliquer tout aussi bien à des réparations plus simples qui se produisent dans la cellule considérée isolément. On peut encore la retrouver à un degré plus élémentaire dans les constituants de la cellule elle-même ; on pourra par exemple parler de restauration pour la soudure de deux fragments chromosomiens, un instant séparés par une ionisation.

Le terme « Restauration » n'est donc pas univoque, il demande à être précisé.

Dans ce but, il paraît essentiel de lier la notion de restauration à celle de l'effet considéré. S'il existe des cas où cet effet est relativement simple comme celui dont je viens de parler à propos du chromosome, il en est de plus compliqués lorsqu'il s'agit d'un effet global, conséquence d'un ensemble d'effets élémentaires comme la mort retardée de la cellule. Il en est qui sont plus complexes encore lorsqu'il s'agit d'effets observés sur un tissu, un organe ou un organisme tout entier.

Il semble que la multitude des lésions élémentaires nécessaires pour obtenir un effet d'ensemble rende l'observation de la restauration plus facile, elle peut alors souvent sinon toujours être envisagée du point de vue statistique.

Localisée à des effets élémentaires pris isolément, la restauration devient beaucoup plus délicate à mettre en lumière parce que, considérée séparément, la plupart de ces effets élémentaires ont souvent un caractère irréversible. La notion de restauration ne saurait, à proprement parler, s'accommoder avec celle de l'irréversibilité. Cependant certains effets perceptibles, susceptibles de montrer de la restauration peuvent s'accompagner de lésions élémentaires irréversibles.

Prenons le cas de l'effet qui consiste dans le retard à la division cellulaire après irradiation, on peut observer à propos de cet effet une certaine restauration : le retard peut être réduit. L'effet, retard à la division, est donc réversible. Mais les cellules qui servent à cette expérimentation peuvent cependant porter avec elles des effets indélébiles, par exemple des modifications de chromosomes qui se transmettent à chaque division et qui, par conséquent sont irréversibles. Dans cet exemple, le mot « Restauration » ne peut donc s'appliquer qu'à l'effet observé : le retard à la division. Il serait faux de l'étendre aux autres effets produits par les rayons sur ces mêmes cellules. On doit donc conclure que la restauration est exclusivement liée à l'effet considéré.

Mais, puisque la restauration est la propriété de la matière vivante de réparer une lésion, il est logique de penser que cette faculté doit dépendre d'une série de facteurs particuliers. L'activité métabolique de la cellule doit certainement jouer un rôle particulièrement important et peut-être n'est-il pas loin de la vérité de penser qu'une cellule pathologique, comme la cellule cancéreuse, jouit d'une moins grande faculté

de réparation pour une même lésion que la cellule normale dont elle dérive. S'il en est ainsi on peut mesurer l'importance de ce phénomène dans la radiothérapie antitumorale. Il devient alors nécessaire d'associer à la notion de restauration celle de vitesse de restauration. Cette vitesse va dépendre de l'activité métabolique propre de la cellule. Il faut s'attendre à ce qu'une cellule fortement irradiée répare moins vite ses lésions que si elle l'avait été plus faiblement. La vitesse de restauration va donc se trouver liée elle-même non seulement à la nature de la cellule mais encore à son activité et à son histoire, c'est-à-dire aux événements qui auront précédé l'irradiation.

Du point de vue pratique la restauration paraît être essentielle pour le radiothérapeute, depuis longtemps elle semble avoir empiriquement trouvé la démonstration de son importance dans la constatation, aujourd'hui bien établie, de la meilleure efficacité de certains traitements lorsqu'ils sont étalés et fractionnés, comme depuis longtemps l'a démontré avec Regaud l'Ecole Française de l'Institut du Radium. Toutefois, mal dégagée, mal connue, la restauration mérite, semble-t-il, une étude approfondie, et ce sont ces considérations qui nous ont conduit à pousser nos recherches.

Pour restreindre la complexité de l'analyse, j'ai, comme la plupart des auteurs, utilisé des éléments biologiques simples. Mon choix s'est porté sur les œufs de Bombyx Mori ou graines de vers à soie. Il s'agit là d'éléments simples, robustes, de petite dimension et d'une grande homogénéité. Ces éléments me sont fournis depuis longtemps par un établissement séricicole bien connu ; ils répondent à des races autochtones, parfaitement sélectionnées qui, au cours de ces cinq dernières années se sont montrées d'une régularité absolue dans les réponses expérimentales. Ils peuvent à ce point de vue être largement comparés aux œufs de Drosophila dont Packard a souligné si justement tous les mérites, en dosimétrie biologique. Ils présentent sur les Drosophila un avantage réel, celui de ne pas exiger un élevage spécial, d'être peu fragiles, de demander un temps assez long pour l'éclosion et la propriété de n'entrer en incubation que lorsqu'ils sont placés à une température de 21°C. Mais ils présentent aussi le très grand désavantage de ne pouvoir être utilisés que pendant une période assez courte de l'année.

L'œuf de ver à soie, comme tous les œufs, ne saurait évidemment être considéré comme un élément biologique très simple, ce n'est peut-être pas une unité biologique parfaite, mais son indépendance absolue à l'égard du milieu extérieur et sa robustesse constituent des propriétés qui sont peut-être uniques.

L'effet que j'ai choisi dans toutes mes expériences est un effet simple et facile à observer : *c'est la non-éclosion*. Lorsque j'emploi le qualificatif de simple, il s'applique uniquement à l'effet global, car il est bien certain que cette non-éclosion est la conséquence d'un multitude d'effets élémentaires que nous ne connaissons pas complètement pour l'instant.

Je ne reprendrai pas ici en détail toutes les expériences, mais je les résumerai comme suit :

1° **Etude de l'effet en fonction de la dose.** — Si l'on trace les courbes de survivance en fonction de la dose, on obtient une courbe classique du type sigmoïde. L'allure générale de toutes les courbes ne change pas, quel que soit le mode d'administration de la dose. Nous trouvons une première portion, peu inclinée, permettant de soulever l'hypothèse de l'existence d'un seuil, puis la courbe s'incurve brusquement pour suivre une pente assez accusée, cette portion est presque rectiligne, montrant ainsi que l'effet est proportionnel à la dose reçue, puis la courbe s'incline à nouveau pour tendre asymptotiquement vers l'axe des abcisses.

2° **Démonstration de la restauration.** — Si nous effectuons une série d'expériences en administrant des doses croissantes, mais chacune d'elles étant donnée en une fois et d'une façon instantanée avec un débit de 3000 *r*/minute, les résultats observés permettent de tracer une courbe du type sigmoïde et nous constatons que 50 % de l'effet est obtenu pour une dose de 1200 *r*.

Si nous effectuons des irradiations fractionnées avec deux doses égales, séparées par un intervalle de 8 heures, nous obtenons des courbes, également du type sigmoïde mais nettement décalées vers la droite par rapport à la courbe obtenue avec une dose unique. Dans ces conditions il nous a fallu constater qu'il fallait environ 1700 *r* de dose totale pour obtenir 50 % de l'effet. Avec un intervalle de 24 heures, il faut 2000 *r* pour obtenir 50 % de l'effet. Cette augmentation de la dose totale exprime donc bien ce qu'il est convenu d'appeler « la restauration » il est admis que dans l'intervalle des irradiations une partie de l'effet produit par la première irradiation s'est effacée. Il faut donc, lorsque l'irradiation est donnée en deux fois à huit heures d'intervalle, augmenter d'un tiers la dose totale pour produire le même effet que par irradiation unique (fig. 1).

Deux doses partielles égales, données à des intervalles plus grands, 24 et 48 heures, donnent des résultats à peu près identiques.

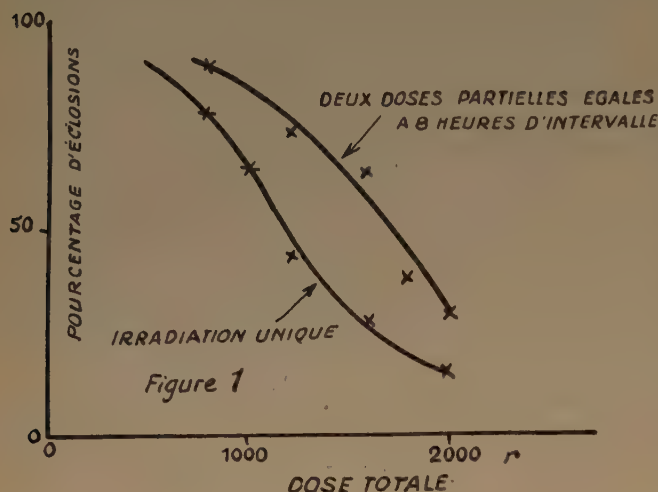


Fig. 1.

Il est donc permis de penser que toute la restauration est terminée dans les 24 heures qui suivent la première irradiation, et extrêmement avancée au bout de huit heures.

3° **La restauration est bien sous la dépendance de l'activité cellulaire.** — Nous avons fait un grand nombre d'expériences pour lesquelles les œufs ont été placés en glacière à 0°C environ, dans l'intervalle des irradiations et nous avons constaté que les doses totales nécessaires pour produire l'effet dans ces conditions étaient strictement égales à celles nécessaires pour obtenir le même effet par dose unique. Dans une série d'expériences, nous avons irradié les œufs au milieu de l'hiver par une première dose partielle et laissé les œufs en glacière pendant trois mois environ avant de donner la seconde irradiation. Les doses totales pour produire l'effet étaient identiques à celles obtenues par l'irradiation unqiue.

On peut donc dire que dans tous ces cas, la sommation des doses est parfaite, il ne s'est pas fait de res tauration dans l'intervalle et il est logique de mettre cette absence de restauration sur le compte du froid qui suspend à peu près complètement le métabolisme et par suite arrête à peu près complètement le processus de défense.

4° **Etude de la vitesse de restauration.** — Nous avons pratiqué une série d'irradiations fractionnées à doses partielles égales mais avec des écarts de 8, 5, 3, 2 et 1 heure. Chaque expérience contenant deux séries de lots : un lot servant de test était placé en glacière dans l'intervalle qui sépare les irradiations, l'autre laissé à la température de 21°C. Toutes les courbes répondant à la mise en glacière sont exactement superposables, tandis que les autres s'écartent de la courbe à dose unique et s'en rapprochent progressivement à mesure que l'intervalle se raccourcit. Pour des ordonnées répondant à 50 % de l'effet on trouve pour huit heures un écart répondant à 500 *r*, pour 5 heures à 350 *r*, pour 3 heures à 200 *r*, pour 2 heures à 100 *r*, et pour une heure à 50 *r*. La courbe obtenue en portant d'une part les écarts et d'autre part les variations de dose n'est pas une droite. Si l'on porte en abcisse l'intervalle qui sépare deux irradiations et en ordonnées l'effet qui persiste après la première dose de 500 *r* ; on obtient une courbe qui a une allure assez particulière et qui ressemble à une courbe exponentielle sans en avoir exactement les caractères.

La restauration paraît pratiquement terminée et totale au bout de huit heures lorsque la première dose est de 500 *r* et l'effet observé : la non-éclosion de 50 % des individus.

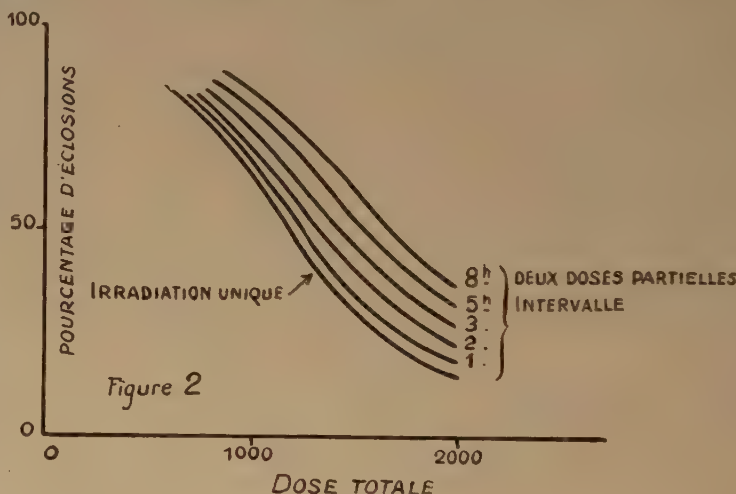


Fig. 2.

5° **Relations entre la valeur de la 1re dose et celle de la 2e.** — Nous avons procédé à des expériences en faisant varier la valeur de la première dose. Dans une série, cette première dose était de 100 *r*, dans la suivante de 200, puis de 300, 500, 700 et 1000 *r* et nous avons tracé les courbes de survivance en fonction de

la dose totale, dans ces cas, les deux doses partielles étaient séparées par un intervalle de huit heures.

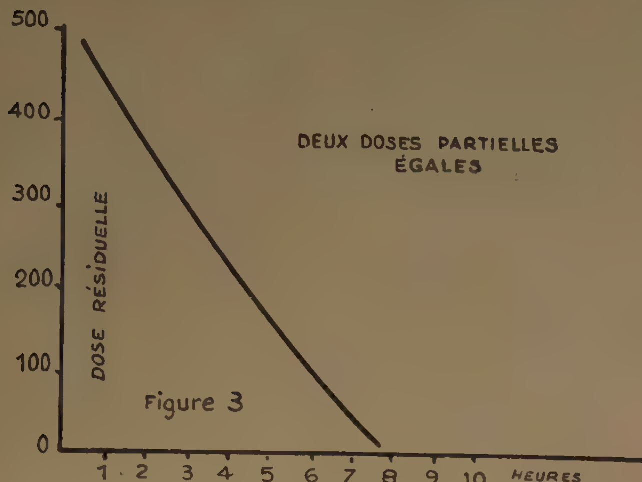


Fig. 3.

Lorsque les doses partielles étaient de 100, 200 et 300 *r*, les courbes de survivance étaient pratiquement superposables, aux erreurs expérimentales près. Mais à partir de 500 *r* on peut voir nettement se

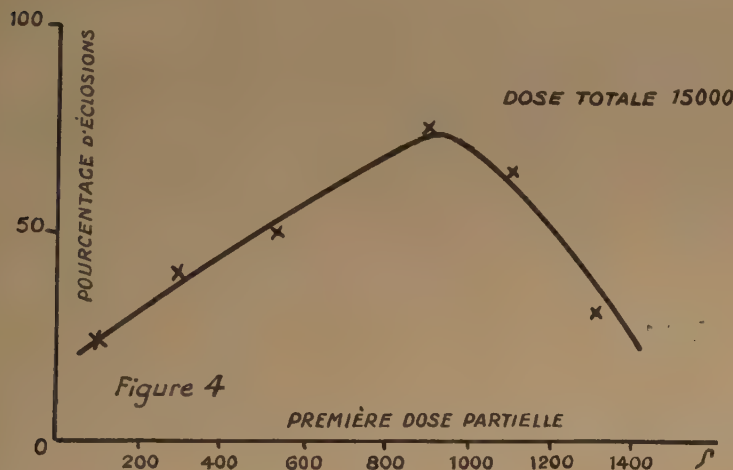


Fig. 4.

détacher les courbes qui, tout en gardant leur allure générale, se déplacent légèrement vers la droite. Cependant à partir des premières doses partielles de 1000 *r*, les courbes ont tendance à se déplacer en sens contraire c'est-à-dire de revenir vers la gauche. Il est donc permis de conclure que de petites doses initiales sont réparées à peu près complètement dans l'intervalle de repos et que somme toute, c'est à peu près la seconde dose seulement qui conditionne l'effet. Mais pour des doses initiales plus fortes, la restauration se montre plus nettement et paraît passer par un maximum. Pour compléter cette relation entre la dose initiale et la seconde dose, une série d'expérience a été faite en faisant simultanément varier la dose initiale et la seconde dose, mais de telle sorte que la dose totale soit toujours égale à une même valeur soit 1500 *r*.

En traçant une courbe portant en abscisses la valeur de la première dose et en ordonnées le pourcentage des individus résistant à l'effet observé, nous avons obtenu une courbe passant par un maximum. Ce maximum répondant à une valeur de la dose initiale de 900 *r* environ. Il est alors permis de conclure que, pour obtenir le maximum de restauration dans le cas particulier de nos expériences il fallait donner une première dose partielle un peu inférieure aux deux-tiers de la dose totale. Cette notion de la doses initiale optimum pour la restauration peut-être, on le conçoit, d'un très grand intérêt si on la tranpose dans le domaine de la thérapeutique.

Conclusions. — Nous pensons, par cette série d'expériences démontrer : 1° l'existence de la restauration après irradiation par rayons X ;

2° Souligner sa relation avec l'activité métabolique des cellules ;

3° Montrer qu'il est possible d'apprécier convenablement la vitesse de restauration. Enfin qu'il existait dans le cas de deux irradiations successives avec un intervalle donné, une valeur du rapport Dose initiale/Dose pour laquelle la restauration se manifeste d'une façon plus marquée.

4° Qu'il existe dans le cas de deux irradiations successives données avec un intervalle de 8 heures, une condition où la restauration se montre mieux, et qui répond à celle où la valeur du rapport ; première dose partielle sur dose totale est environ égal à 2/3.

PROTECTION CONTRE LE RAYONNEMENT X PAR LE CYANURE ET LE NITRURE DE SODIUM

A. HERVE, Z. M. BACQ et H. BETZ (*)
de l'Université de Liége

Les travaux récents de Patt et de ses collaborateurs [13] montrant l'effet protecteur de la cystéine contre les rayons X, accroissent l'intérêt de nos observations sur l'effet protecteur du cyanure de sodium présentées à la Sté belge de Biologie en mars 1949.

Plusieurs travaux publiés par les biologistes français et anglais mettant l'accent sur la présence d'eau oxygénée dans l'eau irradiée nous avaient poussés à étudier le phénomène sur le muscle isolé de grenouille (rectus abdominis). Nous avons pu démontrer que ce muscle, irradié à dose thérapeutique par rayons X ou baigné dans une solution contenant du radiophosphore (ion phosphorique), répondait à une stimulation au KCl par une contracture semblable à celle qui avait été observée par Bacq après l'action de H_2O_2 [1,2].

Dustin et Gompel [7] ont injecté du peroxyde d'hydrogène par voie intrapéritonéale chez la souris et ont observé que ce corps était un poison radiomimétique. Ces observations concordent avec nos conceptions sur l'action des agents oxydants comme « substance thioloprive » [3]. Frederic [8] a montré que les groupes SH disparaissent de la peau du cobaye après irradiation par rayons X.

Herve et Lecomte [9] ont réussi avec la semicarbazone de l'adrénochrome, corps augmentant la résistance capillaire, à inhiber le purpura provoqué par les rayons X mais cette substance n'a cependant aucune action sur la courbe de mortalité.

Nous avons, par contre, obtenu des résultats remarquables avec le cyanure de potassium (ou de sodium). Dans toutes nos recherches nous avons adopté la technique suivante : des souris de race pure C 57 black ou A.K.A. pesant 30 grammes environ et âgées de 4 à 6 mois sont irradiées par groupes de 10 dans une boîte de carton, les constantes d'irradiation étant les suivantes : 230 kV, 18 mA, filtre 0,25 mm. Cu, D.F. 50 cm.. champs 100 cm², durée de l'irradiation 6 à 7 minutes.

Les 270 animaux témoins recevant une dose de 700 *r* meurent tous entre le 4ᵉ et le 10ᵉ jour. Les 230 souris injectées par voie intrapéritonéale de 0,1 mg. NaCN immédiatement avant l'irradiation montrent une survie définitive allant de 50 à 80 %. La même dose de NaCN administrée immédiatement après l'irradiation ne fait que retarder la mortalité ; injectée 15 minutes après l'irradiation, elle ne modifie en rien la courbe de mortalité témoin. Une étude statistique ne semble pas nécessaire pour démontrer la signification de ces résultats. Nos conclusions sont basées sur l'observation de 11 groupes de 10 souris.

Le cyanure se détoxique rapidement en SCN grâce à un système enzymatique hépatique mais nous avons montré que NASCN non seulement n'avait aucun effet sur la courbe de mortalité mais encore raccourcissait la période de survie des souris irradiées. Le cyanate de sodium, deuxième produit de détoxication, s'est avéré également inactif. C'est donc à l'anion CN^- qu'il faut rattacher l'action protectrice que nous venons de décrire.

L'efficacité du NaCN en fonction de la dose de rayons X administrée montre que l'action protectrice n'existe qu'aux doses limites entraînant une mortalité de 100 % (dans des expériences 700 *r*). Une dose de 900 *r* ne protège plus que 20 % des animaux. Aux doses supérieures (1200, 1800 *r*) cet effet protecteur ne se marque plus.

Nous avons d'autre part obtenu un effet protecteur marqué avec un corps dont les propriétés enzymatiques sont très semblables à celles du cyanure, le *nitrure de sodium.*

Utilisant la technique précédemment décrite, nous sommes parvenus avec une dose de 0,1 mg. injectée par voie intrapéritonéale immédiatement avant l'irradiation à protéger de manière définitive 40 % des souris irradiées [12].

(*) Université de Liége, Laboratoires de Radiologie, de Pathologie générale et d'Anatomie pathologique.

Nous avons démontré que l'injection intrapéritonéale de glutathion (2 mg.) pratiquée immédiatement avant l'irradiation entraînait une survie définitive de 50 % des animaux mais aussi — fait plus intéressant — que l'injection simultanée de cyanure de sodium (0,1 mg.) et de glutathion (2 mg.) se traduisait par une sommation des effets. Une irradiation totale de 700 *r* après cette injection ne provoque en effet qu'une mortalité de 5 à 10 % des animaux alors qu'elle tue en 10 jours tous les témoins et qu'elle entraîne encore la mort de 30 % des souris protégées par le cyanure seul.

Avec des doses supérieures à 800 *r*, les courbes de mortalité se superposent à celles que l'on obtient avec le NaCN employé seul comme protecteur.

Ces expériences démontrent que l'effet protecteur du cyanure et du nitrure est limité et que la lésion biochimique fondamentale provoquée par l'irradiation aux X se constitue presqu'entièrement pendant l'irradiation. Il n'existe qu'un très faible effet retardé. L'intervention de radicaux libres à vie courte est compatible avec nos observations dont la théorie de la cible (action directe, « hit or target theory ») ne peut raisonnablement rendre compte.

Ainsi que l'a souligné Betz [6], l'étude histologique des organes les plus sensibles (thymus, ganglions lymphatiques, rate, intestin grêle, testicule) prélevés chez des souris irradiées témoins et des souris irradiées après injection de NaCN montre qu'il n'y a aucune différence dans l'intensité des lésions histologiques. Les deux groupes d'animaux présentent des radio-lésions identiques qualitativement et quantitativement. Par contre, l'étude des lésions en rapport avec un « syndrome d'alarme » montre des différences importantes.

Les souris irradiées seulement présentent une vidange considérable des lipides cortico-surrénaliens — vidange surtout marquée vers le 6e jour — et une surcharge graisseuse progressive du foie. Les animaux injectés au préalable de cyanure montrent une vidange surrénalienne beaucoup plus légère et inversement leur foie se charge très modérément de graisse. Les seules différences anatomo-pathologiques visibles entre les deux lots plaident donc pour l'existence d'un syndrome d'alarme chez les souris irradiées, syndrome partiellement inhibé par l'administration préalable de NaCN.

L'on peut se demander, non sans raison, si la mort des animaux irradiés (dans les conditions d'expérience dont nous avons parlé) ne doit pas être attribuée davantage à un syndrome d'alarme qu'aux lésions cellulaires puisque chez les souris injectées de cyanure et irradiées, la mortalité est fortement diminuée alors que les lésions cytologiques ne sont en rien modifiées. S'il en est ainsi, le test de mortalité choisi par maints auteurs permet-il de mettre en évidence une protection spécifique vis-à-vis des radiations ionisantes ?

La responsabilité qui échoit au cyanure dans ce phénomène de protection reste encore à élucider. On ne peut cependant s'empêcher de rapprocher ces effets de l'action inhibitrice du NaCN vis-à-vis des systèmes enzymatiques. Cette interprétation peut trouver une confirmation dans les récents travaux de Herve et Bacq [12] qui ont signalé que le nitrure de sodium (NaN_3) dont les propriétés enzymatiques sont très semblables à celles du cyanure, protégeait également les souris soumises à des doses léthales de radiations ionisantes.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Bacq Z. M. — *Acta Biol. Belg.*, 1941, **1**, 165.
(2) Bacq Z. M. — *Bull. Acad. Roy. Med.*, 1942, **108**.
(3) Bacq Z. M. — *Experientia*, 1946, **2**, 349 et 385.
(4) Bacq Z. M., Lecomte J. et Hervé A. — *Arch. Int., Physiol.*, 1949, **32**, 537.
(5) Betz H. et Herve A. — *C. R. Soc. Biol.*, 1950 (en public.).
(6) Betz H. — *C. R. Soc. Biol.*, 1950 (en public.).
(7) Dustin P. et Gompel C. — *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 874.
(8) Frederic J. — *Arch. Biol.*, 1949, **60**, 79.
(9) Herve A. et Lecomte J. — *Arch. Int. Pharmacol.*, 1949, **79**, 109.
(10) Herve A. et Bacq Z. M. — *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 881.
(11) Herve A. et Bacq Z. M. — *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **143**, 1158.
(12) Herve A. et Bacq Z. M. — *C. R. Soc. Biol.*, 1950 (en public.).
(13) Patt H. M. et coll. — *Science*, 1949, **110**,213.

PROTECTION FROM WHOLE BODY-IRRADIATION BY CHEMICAL MEANS

Dr. R. H. MOLE (Harwell-England)

When we started this work in England, at the Medical Research Council Unit at the Atomic Energy Research Establishment at Harwell, on the possibility of protection against whole body irradiation, I felt, as a biologist, that the search was likely to prove an ineffectual one. The very fact that all the cells of the body are irradiated uniformly suggests that there could be no specific single lesion and that the effects of whole body irradiation must be due to the sum of a variety of different biochemical lesions. The results that we have had so far are no better, I think, than those reported by others, but they may prove of interest, nevertheless.

On either a target hypothesis or a theory of intermediate radicals a small reduction in the effect of irradiation may be possible because it is quite easy to imagine that there must be physiological conditions which would alter the size of a target, or the number of targets in a given volume, or the reactivity of molecules to the free radical produced. This idea however did not provide any starting point that was not purely speculative, so that we began by trying to repeat in whole animals the work of Dr. Dale ([1]) on protection against ionising radiation *in vitro*.

The experiments were done with a genetically pure strain of CBA mouse bred in our own animal rooms. In order to reduce uncontrolled sources of variability, especially alarm reactions, they were boxed in groups of four of the same sex at the time of weaning and left together for another two months before being used. Each group was irradiated in its aluminium living cage without being transferred to any special irradiation box, and with normal access to food and water. As far as the animals were concerned, their cage was merely transported by hand to the X-ray room and taken back again, and I hope that, otherwise, they did not notice anything unusual.

We irradiated the cages from below so that the food hopper and water bottle on top of the cage in the lid should not interfere with the uniformity of irradiation. Direct measurements inside the cages with Victoreen meters, and with small condenser dose-meters (M. R. C. pattern B. D. 2), showed that the largest difference between two points in any of 4 cages, irradiated at one time, was 6 %. Uniformity was achieved mainly by using a stepped filter in the X-ray tube ; also the animal cages were made of uniformly thick aluminium.

The dose rate was 7.6 *r*/min, which meant that the radiation lasted some two hours. To ensure 100 % mortality, we needed to give nearly 900 *r* to the CBA strain of mouse. We used this strain because we found that it seemed to respond more uniformly to radiation, as judged by the dose mortality curve, and also the time to death, than our other strains, indluding C 57's.

In the first experiment, because we were so little sanguine of getting any result at all, we gave initially a sublethal dose of radiation immediately after we had injected the mice. Three months later we repeated the injection, and followed it with a lethal dose of radiation, hoping that in this way we would magnify any protective effect of the materials injected.

TABLEAU I

Material injected intraperitoneally	Nomber of mice	Survival per cent	P for difference in mortality from group given saline
0.15M Saline	6	0	—
0.28M Thiourea	8	88	0.002
0.1M Sodium ethane-di-thio-phosphonate	7	86	0.004
0.28M Glycerol	8	50	0.08
0.1M Sodium–thiosul–phate	8	38	0.15
0.1M Sodium–dithio–nate	8	0	—

The results are given in Table 1 (already published ([3])). Weused saline as a control, which is not, perhaps entirely satisfactory. It is unfortunate that two of our control animals died from intraperitoneal haemorrhage immediately after the second injection, but the results nevertheless seem clear cut.

Thiourea had been chosen because it was found especially effective in vitro by Dale, and because it was likely to penetrate the whole of the body's protoplasm and yet be relatively non-toxic.

Sodium ethanedithiophosphonate had been synthesised for (but not actually used in) protective experiments against mustard gas on the grounds of its ability to compete for OH radicals. The corresponding ethanemonothiophosphonate bas been shown to have some protective action against the systemic effects of injected mustard gas in rats (Holiday, Philpot and Stocken (1950).

Glycerol, sodium thiosulphate and sodium dithionate might be expected on theoretical grounds to compete for OH radical. The mortality figures perhaps exaggerate the effect of glycerol ; the animals which recovered did so after a long period of illness, unlike those treated with thiourea which did not ever look ill at all.

Sodium thiosulphate we later found was excreted very rapidly so that its concentration in the body must have fallen very considerably long before the end of the two hour irradiation period.

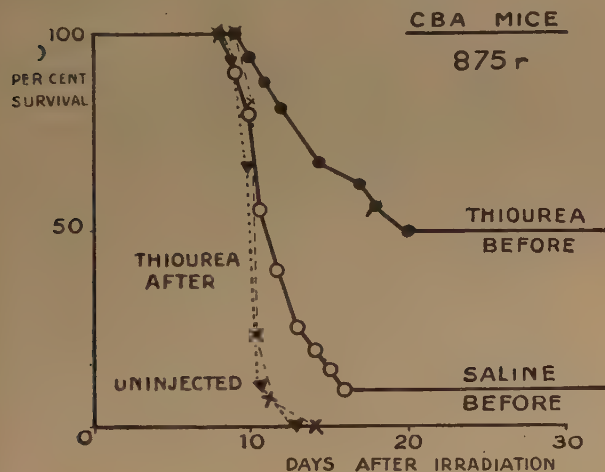


Fig. 1. — Survival of CBA mice after whole-body irradiation with 875 *r*.

●———● Thiourea 0.28 M 2 ccs. intraperitoneallyna few minutes before irradiation.

×-----× Thiourea 0.28 M 2 cc. intraperitoneally a few minutes after completion of irradiation.

○———○ Saline 0.15 M 2 ccs. intraperitoneally a few minutes before irradiation.

▲·····▲ Uninjected.

The result with thiourea was confirmed in a second experiment (Fig. 1) where the mice were 3 /12 old, and all male, and only one injection and one dose irradiation was given, 875 *r*. There were 60 mice in four groups shown. The protective effect of thiourea given immediately before irradiation was again definite (*). With this particular strain of mouse, we do not get any deaths at all until the 9 th day, and if they are going to die, they usually die by the 16th or 17th day.

As in Professor Bacq's experiments with cyanide, the protective substance works when given just before radiation, and does not work when given immediately after. Nevertheless, I feel that one cannot conclude for certain that the biochemical lesion of whole body irradiation must be occurring during the period of radiation.

It is only fair to point out that the reduction in mortality caused by thiourea, though substantial, is only equivalent to a reduction in the effectiveness of radiation by about 10 % or 15 %, judging by our dose-mortality relation, and that, of course, is not really very much.

Accepting that thiourea had some effect, we did a very preliminary experiment to find out something of the mechanism of its action. CBA mice were used again, and this time were given 600*r*, which, in our experience, does not kill more than one mouse in about 50. Again, to avoid any alarming reaction, the mice were not handled after irradiation until they were picked out of the cage, weighed and killed at the same time as blood samples were taken.

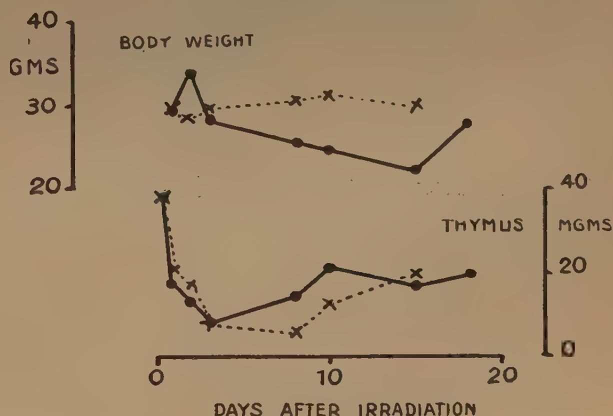


Fig. 2

The saline treated animals lost about 25 % of their body weight but the thiourea animals did not lose any body weight (Fig. 2).

In the first three days the weight of the spleen

(*) This has been confirmed in subsequent repetitions of this experiment, and has also been demonstrated by Limperos and Mosher (1950), *Science*, **112**, 86.

decreased at the same rate in both groups (Fig. 3), but at the 8th and 10th day, the spleen appeared to be considerably heavier in the treated group as compared with the controls.

The haemoglobin and red cell count showed the same changes as the body weight ; the thiourea group showed a small early fall, but the saline group a steady prolonged fall of about 25 % also.

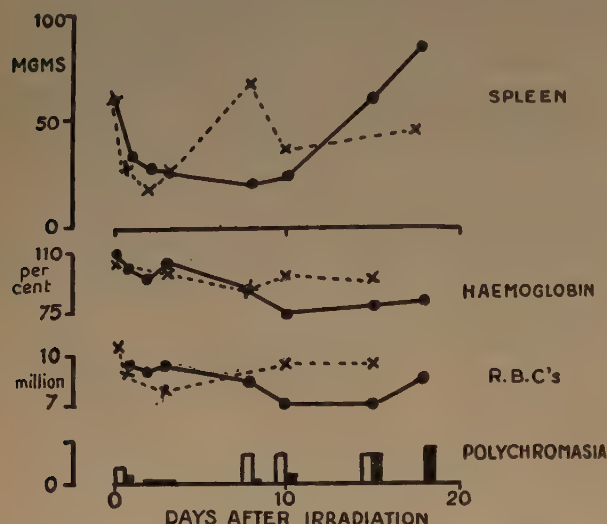


Fig. 3. — In each figure the continuous line represents the control group, the broken line the group given thiourea before the irradiation.

Reticulocyte counts were not done. Red cell polychromasia in the stained film was present initially but disappeared by the second day after irradiation in both groups. Pronounced polychromasia returned in the protected group by the eighth day but not till a week later in the control group, in agreement with the pattern of red cell counts. Platelets also returned in large numbers earlier in the thiourea than in the saline group.

The natural fluctuations of white cell counts makes deductions from such a small number of animals insecure. Also the counts were done on heart blood and there may be a surprising difference between white cell counts on heart blood and tail blood in the same animal.

A variety of tissues were examined microscopically from each mouse in this third experiment. There was no obvious difference between thymus and lymph nodes in the two groups in agreement with the similar rates of weight loss by the thymus (Fig. 2).

There was no striking difference in the initial necrosis of the bone marrow in the two groups either. There was, however, a definite difference in the later specimens of bone marrow, from the lumbar vertebrae and from the shaft of the femur, and of the spleen.

Figure 4 shows the marrow in the vertebral body of the control at ten days, where nucleated cells are present only in very small numbers. In the corresponding section from the protected mouse at the same time interval after irradiation, the marrow is almost solid with nucleated cells (Fig. 5). Under a higher magnification all varieties of haematopoiesis can be seen. Figure 6 shows a transverse section of the femur shaft in the same control, Figure 7 the same area in the protected mouse and the difference is even more marked.

Ectopic haematopoiesis was marked in the larger spleens of the protected group at the eighth and tenth days but absent from the control spleens at these times.

Pathologically speaking, therefore, thiourea does not seem to protect the marrow, but does allow of much earlier regeneration of haematopoietic tissue as judged by tissue changes in the marrow, by haemoglobin and red cell counts, by polychromasis, and by changes in weight and in microscopical appearance of the spleen. In control animals examined later, at 15 and 18 days, the re was relatively much more ectopic haematopoiesis in the spleen as judged microscopically and by weight changes, and this is presumably another index of the less efficient repair of the marrow in the control group as compared with the protected.

With a haemoglobin of 70 % of normal an unprotected animal cannot be said to die of anaemia, so that the protective effect of thiourea on the marrow is not a sufficient explanation of the way in which thiourea reduces radiation mortality. More significant may be the sparing action of thiourea on body weight which was also noticeable at 1000 and 1200*r* even though the animals all died. But this effect was mediated by some effect on tissues which was not detected histologically.

Since SH enzymes are among the most sensitive to radiation *in vitro*, it is often supposed that these must be damaged in whole body irradiation and the suggestion is then obvious that thiourea acts by protecting directly the SH-containing substances of the body, but that is the one explanation that we think is unlikely. If the degree of damage to SH-enzymes were physiologically important, irradiated animals should be more easily poisoned by arsenic than normal animals. However, direct experiment has failed to reveal any striking difference in the



Fig. 4. — Body of lumbar vertebra in control ten days after irradiation.

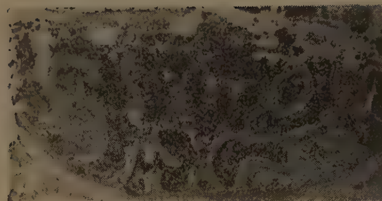


Fig. 5. — Body of lumbar vertebra in protected mouse ten days after irradiation.

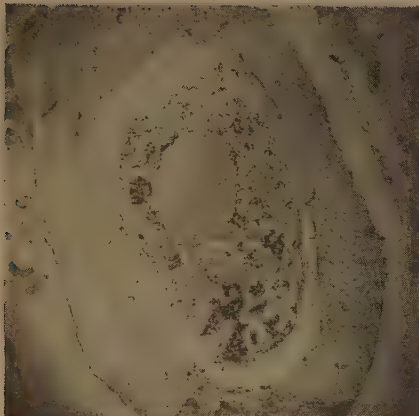


Fig. 6. — Shaft of femur in control ten days after irradiation.

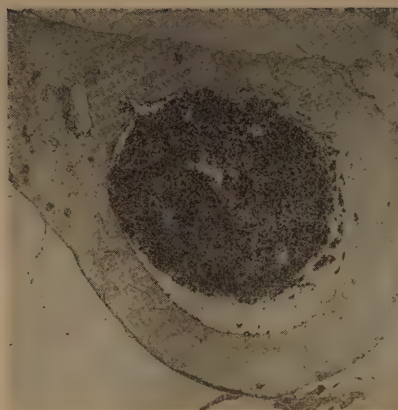


Fig. 7. — Shaft of femur in protected mouse ten days after irradiation.

toxicity of sodium arsenite during the first few after a lethal dose of irradiation.

The immediate practical importance of thiourea is clearly not great. Further the dose of thiourea used, equivalent to 19 mM or 1.5 gms. per kilogram, was about half the lethal dose.

There are suppising differences in the toxicity of thiourea among different strains of mouse, e. g. it is more than one hundred times as toxic to our C 57 mice. This strain variation in toxicity may explain why others have not been able to use thiourea successsfully.

In all this, I feel a better perspective may perhaps be reached by recalling that the dose of radiation required to kill our mice is nearly twice as much as that which Professor Bacq and others required to kill their mice. I cannot imagine that differences in physical measurements or experimental arrangement are responsible for such a difference in dose. Presumably, therefore, there must be some biological reason for the difference, and if we could only discover what that was, we might be much further on in our knowledge of the mechanism of damage by whole body irradiation.

REFERENCES

(1) Dale W. M., Davies J. V. and Meredith W. J. (1949). — *Brit. J. Cancer*, **3**, 31.

(2) Holiday E. R., Philpot J. St. L. and Stocken, L. A. (1950). — *Biochemical J.*, **47**, 637.

(3) Mole R. H., Philpot J. St. L. and Hodges G. V. R. (1950), — *Nature*, **166**, 515.

DISCUSSION

M. Bonnet-Maury. — En ce qui concerne le facteur biologique dont parlait M. Mole tout à l'heure, Mme Loureau a bien montré que les questions de régime ont une importance considérable, et il y a en plus, vraisemblablement, des variations saisonnières.

On ne peut donc pas être étonné du fait que dans des laboratoires différents des souris de races différentes, alimentées de façon différente, soumises aux mêmes doses de rayons X, donnent des courbes très différentes.

Dans ce domaine, entre 200 et 1.000 R, les facteurs biologiques jouent au maximum et il est nécessaire de préciser, d'une façon extrêmement stricte, les conditions d'expérience pour avoir des résultats comparatifs. Pour ces doses supérieures les facteurs jouent beaucoup moins, comme nous l'avons montré avec M. Patti.

M Betz. — Dans le même ordre d'idées, je voudrais faire remarquer que les souris T. B. A. semblent avoir un comportement hormonal différent de celui des souris C 57 utilisées. Cette classe de souris est d'un taux de folliculine beaucoup plus élevé que le taux des souris C 57. D'après les estimations du Dr Kortverck (?) d'Amsterdam, il pense que le taux de folliculine est de 4 à 5 fois plus élevé chez les T. B. A. que chez les C 57. Il y a peut-être là aussi une cause de différence de sensibilité.

M. Bacq. — Je voudrais remarquer une chose au sujet du groupement SH. Ces groupements sont connus comme des agents de transfert de la polymérisation, c'est-à-dire qu'ils cèdent très facilement leur hydrogène en stabilisant les radicaux libres.

Dans beaucoup de cas, il est possible de s'imaginer que les composés produits après la cessation de H soient suffisamment stables pour ne pas amorçer de nouvelles chaînes, pour ne pas commencer une nouvelle réaction des radicaux libres.

C'est un point auquel il faudrait penser et pour la même raison je crains que l'expérience proposée par le Dr Gray ne soit pas décisive, parce que, dans les deux cas, on produit des radicaux libres, et on va avoir exactement le même phénomène sur le groupement H et sur le groupement S.

Dr Lamerton, — In view of the differences between Dr Mole and Professor Bacq, I would like to ask whether, in fact, they fed them on the same diets. It is beginning to look as if the actual protein diet does control the lethal dose required.

Dr Gray — I can't help thinking that experiments with neutrons might sort out this question as to whether it is a difference of protection on the primary chemical processes, or whether the drugs administered change in the general sensitivity of the cells.

If the effect of the drug were to change the character of the cell, biologically you would expect to have the same effect with neutrons on X-rays ; if the differences are associated primarily with the chemical change, you would get differences, and I think we might be able to sort the thing out in this way.

Have you tried the comparison between the two radiations.

Dr Mole. — We have not tried that, but we are going to do.

Dr Bacq. — We also have tried BAL. BAL delays mortality a little bit on maximum doses, but it does not give any permanent survival, and we have also given up the explanation that it is the protection of the SH groups. Explanations of Patt's experiment are note a protection of SH groups, and my experiments have shown that the amount of thioura that you can find in the tissue is not changed at all immediately after a lethal X-radtion of the body.

STUDIES ON THE PROBLEME OF PROTECTION AGAINST THE EFFECTS OF X RAYS

By M. ARNE FORSSBERG (Stockholm)

Numerous investigations have given evidence for the existence of an indirect effect of ionizing radiation on enzymes in diluted water solutions as well as the so called « protective effect » when certain substances are added to that solution before irradiation. DALE and others (1) and BARRON (2) have especially focused the attention on the sulphydryl containing enzymes which are quite radiosensitive in a pure water solution. The respiration of tissues and the oxidation of substrates requiring such enzymes are stated to be decreased already after doses of 1.000 *r* or below. (BARRON) Then, PATT and others (3) in biological experiments proved, that injections of cystein immediately before the X-ray dose, saved an appreciable part of various animals from death.

The mechanism of the cystein action has been tentatively explained as depending on the sulphydrylgroup of the cystein which should compete for the produced hydroxyl radicals thus leaving a certain amount of the enzyme molecules intact. From other authors a biological protection against ionizing radiation has been stated to take place after injection of cyanid (BACQ and HERVE) (4).

On this occasion, I should like to present a few results of experiments on protection problems using cystein as the protective agent (5). For some experiments, we used an unicellular organism, a Propionibacterium-strain, grown in a synthetic, complete substrate. Cystein was added to a 0.001 m solution. Such concentrations of cystein has no effect on the normal growth rate of the bacteria, when grown in a complete substrate. We waited some 10 min. before giving the dose (varying from 25-50.000 *r*).

Samples were then transferred into a fresh growth substrate, and the cell-number in the growing cultures counted at suitable times and compared with parallell controls. It turned out that, apart from cystein, also thioglycolic acid and thiourea were protective to some degree, while glycocol and urea were not. The degree of protection as computed from the counts of the cellnumbers showed 25-45 % better growth in the bacterial samples given SH-compounds previous to the irradiation. We noted that thioglycolic acid gave a somewhat better protection when irradiated in nitrogen than in air. This fact may possibly be explained as depending on a rapid oxidation of the acid by the bacteria when in aerobiosis.

The growth of a bacterial culture in generall takes the course of three distinct phaces.

a) After the inoculation we have a time of no celldivision, this is the lag phase. During this time, we may however expect an accumulation and a distribution of nutrients from the substrate, as well as biochemical reactions previous to the celldivision.

b) the logarithmic growth phase with high mitotic activity where celldivision goes on a ta constant rate.

c) The culture finally reachesa stationary phase with constant cell number.

Now, when doing protective experiments both in the lag phase and in the logarithmic growth phase we obtained about the same degree of protection. It seems thus that the protection here is not bound to any special state in the celldivision phase, that is, not dependent on the cellpopulation being in rest or in state of vigorous reproduction.

From these experiments, it would seem that sulphydryl substances in generall, which can be tolerated by the cell, act as protective agents, even if they are no normal metabolites of the organism.

As the cystein obviously acts protecting on single cells in different stages of activity it may be possible to minimize the X-ray effect on a minor part of the whole body through a local injection of cystein. This possibility can be visualized in a rather simple way, f. i. with the hair epilation as a criterion of the irradiation effect.

We used guinea pigs for some trials. The shaved adult animals were given neutralized cystein intracutaneously (acid cystein is of course injurious for the skin), and NaCl-solution on control fields, both given on symmetrical fields of the back of the ani-

mals. In some preliminary experiment, we injected the cystein in small portions in the centre of the field to a total quantity of about 1 mg. The animals where then irradiated immediatly. In order to localize most of the damage to the skin, we irradiated at the low voltage of 50 kV, giving from 700 to 900 *r*.

The picture some 10 days afterwards showed partly normal hairgrowth on small rounded spots situated around the centre of the idjections. Obviously, the concentration of the acid due to incomete spreading was not sufficient all over the fieldld and left most part of it unprotected. The control fields were naked.

When we increased the cystein dose up to round 5 mg. per field and waited some 10 min. before irradiation more consistent results were obtained. The cystein fields were not much damaged, the control fields as before naked. An increase of the dose to 1200 to 1500 *r* gave also some slight damage of the skin of the control fields as was seen from the somewhat rough appearance of the skin surface. The corresponding cystein fields were much better preserved and showed sometimes even scanty hairgrowth.

It may be asked how far such a protective effect could be raised, especially if it should be possible to protect also deeper situated parts of the body, say the normal tissue round a tumour. Such attempts should meet with difficulties because the problem to distribute the cystein is not easy to tackle. Trials to that purpose have so far not given any reliable results.

Obviously, it would seem possible to use the radioactive tracer technique for a study of the mechanism of protective effects. As Professor Hevesy has told us, some investigations with that intention has been started. A number of investigations from the last years has shown that metabolic events in the body are influenced by X-rays in moderate doses. Especially the new synthesis or turn over of nucleic acids is markedly depressed the first hours after an irradiation (Euler, Ahlström, Hevesy, Holmes [6-8]).

In experiments with young, growing mice cystein in concentrations of 0,5 — 1,0 mg/gr. body weight was injected intravenously. followed some 10 min. afterwards of an X-ray dose of 900 *r* total body irradiation and a subcutaneous injection of C^{14} in the form of acetate ($CH_3C^{14}OOH$). In control groups we injected NaCl-solution and proceeded otherwise as stated. In times varying from 1-3 hours later the animals were killed, various organ fractions isolated and there C^{14}-content measured.

Owing to the special significance which one ascribes to the X-ray effects on genes and the nucleic acids of the chromosome it is interesting to note, that the nucleic acid turn over is affected when combining X-rays and this sort of chemical treatment. The C^{14} content of the nucleic acid fraction, which is decreased when irradiating « normal » animals, that is such without cystein, shows on the contrary a quite strong accumulation of the isotope in combined cystein and X-ray treated animals.

The metabolism of fats, proteins and glycogen shows in general the same features, that is, when the animals were given cystein before irradiation we found an increased content of C^{14} in the said fractions. In animals given cystein only we did not become the same high increase in C^{14} incorporation.

A number of investigations from the last years show, however, that the nucleic acid metabolism, as well as the mitotic rate, is often influenced by chemical means or in other ways [9]. The rate of mitosis is f. i. profoundly decreased by adenosintriphosphate and dependant upon the amount of sugar present. Various forms of shocks are also liable to influence upon the rate of mitosis. Moreover the actual condition of the animals during the experiments, e. g. if in rest or activity, fasting or full-fed, plays a decisive role for tracer studies.

The variety of ways in which metabolic or mitotic rate changes can be obtained calls upon some caution concerning the significance one ascribes to metabolic changes caused by irradiation or the combined action of cystein and X-rays as in our experiments. We do not, so far, know much about the eventual importance of these changes as a concomitant cause for the irradiation damage in the body or if they are preferably reversible reactions of secondary importance. Further work is needed here.

REFERENCES

(1) Dale W. M., Davies J. V., and Meredith W. J. — *Brit. J. Canc.*, **3**, 31 (1949).
(2) Barron E. S. G. — *J. Gen. Physiol.*, **32**, 537 (1949).
(3) Patt, H. M., Tyvee E. B., Straube R. L., and Smith D. E., *Science*, **110**, 213 (1949).
(4) Herve A. and Bacq Z. M. — *Compt. rend. Soc. biol.*, **143**, 881 (1949).
(5) Forssberg A. — *Acta Radiol.*, **33**, 296 (1950).
(6) Ahlström L., v. Euler H., Hevesy G. — *Arkiv für Kemi., Mineral. och Geol.*. 1947, xxiv A.
(7) Hevesy G. — *Reviews of Modern Physics*, 1945, xvii, 102.
(8) Holmes B. E. — *Brit. J. Radiol.*, XXII, **487** (1949).
(9) Bullough W. S., and Green H. N. — *Nature*, **146**, 795 (1949).

RECOVERY PATTERN OF THE BLOOD PICTURE IN GUINEA PIGS FOLLOWING A LIMITED TOTAL BODY EXPOSURE TO CHRONIC GAMMA RADIATION

By
EGON LORENZ
National Cancer Institute
National Institutes of Health
Bethesda Maryland
and
Argonne National Laboratory, Chicago, Ill.

It is intended to give in the following a recent phase of our research program which deals with the biologic effects of chronic as well as acute total body irradiation of small laboratory animals on life span, picture of the circulating blood, tumor induction, and effects on the breeding behavior. The complete data will be published in the near future (1). The phase selected for presentation deals with the recovery pattern of chronically exposed inbred guinea pigs which were given a dose of 8.8 *r* daily (8 hours) until the number of erythrocytes in the peripheral blood decreased to approximately 2.8 million cells per mm^3. This value was chosen because experience had shown that usually animal exposed under the same conditions until death lived, on an average, one to two weeks after the erythrocyte count had decreased to this level. Guinea pigs were chosen for these experiments because the degree of the effect on the hematopoietic organs, as reflected in the picture of the peripheral blood, was most pronounced in this species leading invariably to a lethal pancytopenia under the exposure conditions employed, whereas in mice or rabbits exposed to the same daily dose rate it was less pronounced and usually these animals died from other causes such as carcinogenic effects. Moreover, data on guinea pigs indicate a sensitivity of the hematopoietic system comparable to that of man (2).

The experimental arrangement, described elsewhere (1) in detail, was briefly as follows : The animal cages were placed on shelves so that each cage was approximately at an equal distance from the gamma radiation source consisting of a platinum capsule of a wall thickness of 0.5 mm., filled with radiumsulfate (992.5 mg. of radium element). It was 40 mm. long and 6.4 mm. in external diameter. To bring daily exposure periods in line with conditions encountered in humans working with penetrating radiations, a period of 8 hours was used. During the remaining 16 hours of the day the radium source was lowered into a well underground to a depth of approximately 7 m.

The exposure of the inbred guinea pigs was started at the age of 3 months ; 24 males and 26 females were used ; a group of 11 males and of 6 females served as controls. They came from colonies maintained at the National Cancer Institute. All animals were weighed once a week. Data on all cells of the circulating blood were routinely obtained once a week but during the critical period, data were obtained more frequently in order to approach the value of the red cell count of 2.8 million as closely as possible. This, however, could not always be accomplished since the red cell count often decreased over one million within a few days.

It is well known that after acute exposures of experimental animals to doses which will kill approximately 50 percent of the animals within 30 days, a rapid decrease of the cells of the circulating blood sets in until a minimum is reached approximately 1 to 2 weeks after irradiation. During this period a number of animals will die of pancytopenia. Then a rapid recovery process begins and after approximately 4 weeks the picture of the peripheral blood is more or less normal. As a representative example, the effects of acute exposures of hybrid guinea pigs

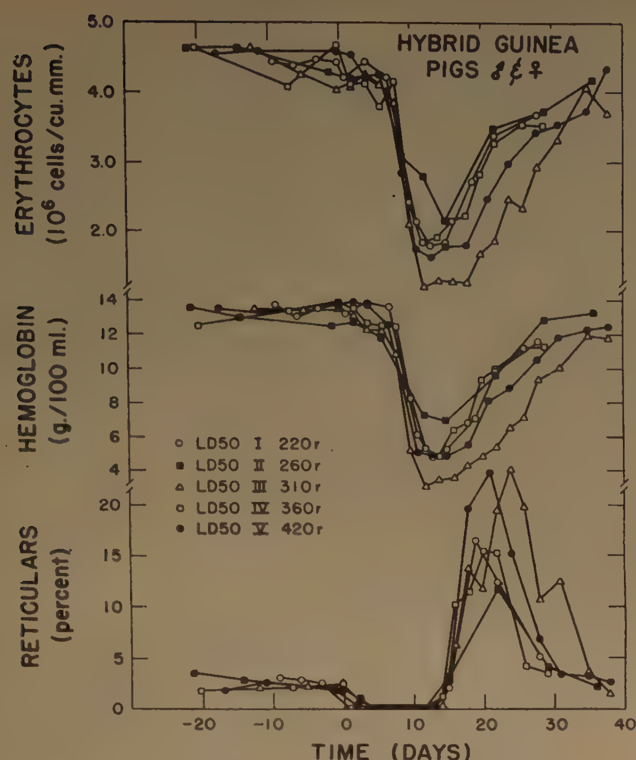


Fig. 1. — Effect of total body exposure to X-radiation of hybrid guinea pigs on red cell count, hemoglobin and reticulocytes.

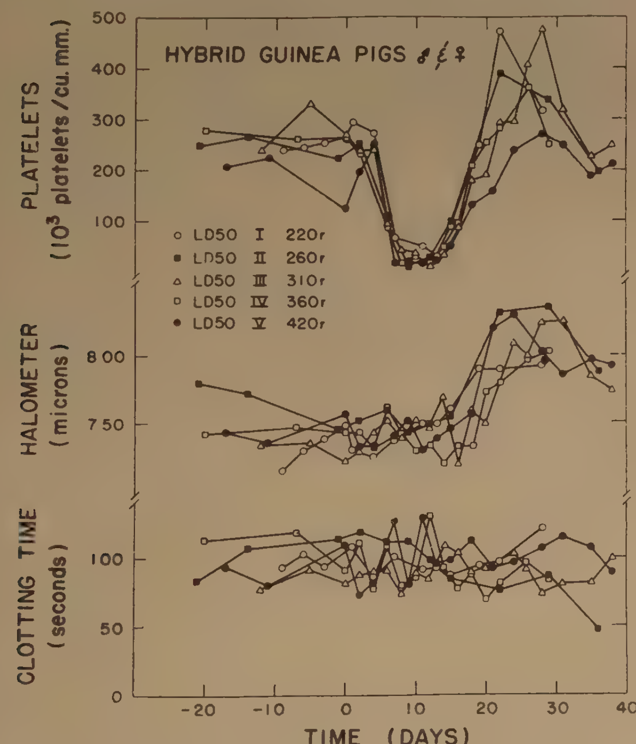


Fig. 2. — Effect of total body exposure to X-radiation of hybrid guinea pigs on platelet count, diameter of red cells and clotting time.

are given for the erythrocytes, hemoglobin and reticulocytes in Figure 1 and for the platelets, diameter of the red cells, and clotting time in Figure 2.

The acute doses in these experiments were 220 *r*, 260 *r*, 310 *r*, 360 *r* and 420 *r*. Blood data were determined on 10 to 12 animals of each group every second or third day. As figure 1 shows, the number of circulating erythrocytes and the hemoglobin content begin to decrease approximately 4 days after exposure, a minimum is reached between 10 and 18 days and is followed by a rapid recovery. During the recovery process large numbers of reticulocytes begin to appear in the circulating blood. The anemia is macrocytic (Fig. 2) the average cell diameter of 7.5 microns increasing to 8 microns and above and the color index approaches or is greater than one. Clotting time (*) is approximately normal during the 30 day period. The picture of platelets (Fig. 2) and of the white series is quite similar to that of the erythrocytes, the only difference being that the decrease begins shortly after exposure.

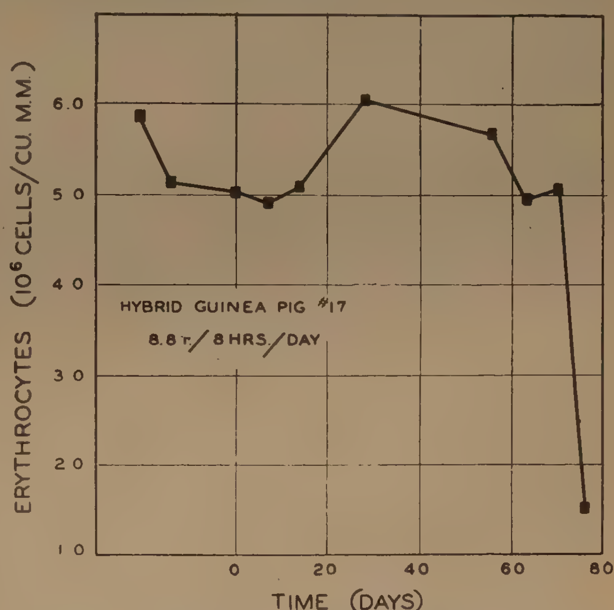


Fig. 3. — Effect of chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on red cell count of a guinea pig exposed until death.

In chronic exposure of guinea pigs under the conditions given, the onset of the anemia is in many cases also abrupt (Fig. 3). On the other hand, a gradual decrease of the cells of the white series and

(*) Clotting time was determined by the capillary tube method which is admittedly crude, but it was used because drawing blood sufficient to carry out other procedures was not feasible. It is only intended to show that major changes in clotting time did not occur during the experiments.

platelets is observed. Recovery of all blood elements in comparison with the observations in acute exposures, however, is in chronic irradiation a very gradual process extending over months, as will be shown later.

In the course of the chronic experiments it became apparent that three phases in the recovery pattern could be observed following the termination of the exposure. In a number of animals no, or only a slight, recovery took place. In others partial recovery occurred, but it was spurious. The remaining animals recovered fully. For this reason, the data on the circulating blood are divided in 3 groups. The first group contains the data of those animals which died within nine weeks following their removal from the exposure field and little or no recovery of the circulating blood was observed. 17 females and 13 males belong to this group. The second group consisted of 3 males and 7 females. Their blood picture recovered partially only to be followed by a second and terminal pancytopenia ; they died within 24 weeks after termination of the exposure. The third group of 4 males and 6 females recovered permanently. In Table I, all pertinent data on the picture of the circulating blood at the termination of the exposure and on survival are given.

For the data of group I, two figures are listed. The upper one contains the data of the whole group of 30 animals. The lower one (in parenthesis) gives the data on 15 animals in which the individual red cell counts were above 2.4 million when the exposure was terminated. The rapid decline of the red cell count made it extremely difficult to terminate the exposure for a red cell count of 2.8 million. In 15 animals the decrease of the red cell count was so abrupt that the exposure was terminated only when the count had dropped to 2.4 million and below. This explains why the majority of all experimental animals belong to group I, the non-recovery group.

No correlation could be found between mean exposure time, mean accumulated dose and mean blood cell counts, if we compare the data of the 15 animals with an erythrocyte count above 2.4 million of group I with the other groups. With the exception of the erythrocyte count of all the 30 animals of group I the other data of the whole groupe I show no correlation with the data of the other groups.

This indicates that only the degree of the anemia and not the degree of the pancytopenia determines whether or not an animal is likely to recover. No significant sex difference was observed in the 3 groups. This lack of sex difference has also been observed

TABLE I. — *Mean exposure time, mean accumulated dose, mean blood data and mean after survival of guinea pigs exposed chronically to a limited dose of gamma radiation.*

Group	Exposure time ± σ (*)	Accumulated dose ± σ (*)	Mean: Erythrocytes per cmm. ± σ (*)	Hemoglobin gr per 100 cc. ± σ (*)	Leukocytes per cmm. ± σ (*)	Lymphocytes per cmm. ± σ (*)	Heterophils per cmm. ± σ (*)	Platelet per cmm. ± σ (*)	After survival ± $\sigma_{\bar{x}}$ (**)
	(days)	(r)							(days)
Controls	—	—	5.4 ± 0.4 × 10^6	12.8 ± 0.9	6900 ± 1800	4600 ± 1700	2100 ± 1400	2.3 ± 0.3 × 10^6	1040 ± 76(***)
I	110 ± 24	964 ± 213	2.4 ± 0.5 × 10^6	6.4 ± 1.6	2100 ± 600	1900 ± 500	200 ± 100	0.2 ± 0.1 × 10^6	19 ± 3
	(119 ± 31)	(1047 ± 275)	(2.8 ± 0.2 × 10^6)	(7.4 ± 0.8)	(2000 ± 600)	(1800 ± 400)	(200 ± 100)	(0.2 ± 0.1 × 10^6)	(21 ± 4)
II	110 ± 15	970 ± 130	2.9 ± 0.3 × 10^6	8.5 ± 0.9	2400 ± 600	2100 ± 500	300 ± 200	0.3 ± 0.1 × 10^6	112 ± 11
III	108 ± 7	950 ± 59	2.9 ± 0.4 × 10^6	8.6 ± 1.1	2000 ± 500	1800 ± 500	200 ± 100	0.2 ± 0.1 × 10^6	673 ± 118

(*) Standard deviation.
(**) Standard error.
(***) Estimated as 2 animals are still living.

in other experiments where, in chronically or acutely exposed guinea pigs, the mean accumulated dose or the acute dose killed approximately the same number of males and females. For this reason the date are presented for the combined sexes. In the following figures (4 to 12) the day of the termination of the exposure was taken as zero day regardless of the length of time the animals were exposed. It was considered desirable to do this, instead of taking as zero day the day the exposure was begun, since the exposure time for the different animals varied considerable. This procedure gives not the initial phase of the effect of the irradiation on the picture of the circulating blood because it tends to smooth it out. However, it gives the progress of the anemia and recovery phases accurately. Because of limitations of space only the curves for the red cells, the leukocytes, hematocrit, cell size, and stippling cells are given.

In group I the red cell count (Fig. 4) and concomitantly hemoglobin and hematocrit (Fig. 6) continue to decrease and no recovery is apparent for approximately 6 weeks. Most animals of this group die during that time. In the few that survive up to 9 week a slight recovery is observed but, nevertheless, these animals also die. The platelets on the other hand do not decrease in numbers following the termination of the exposure, they show instead even a slight increase in the following weeks and this is considerable in the few animals that live longest. The leukocyte count (Fig. 5) increases rapidly after the termination of the exposure and as the last animals approach death it reaches values higher than those of the controls. This is a reflection of an increase in both lymphocytes and heterophils. There is an indication of a macrocytosis (Fig. 6) as shown by a slight increase of the diameter of the red cells followed by a microcytosis in the animals surviving longest. The percent stippling of red blood cells increases considerably after termination of the exposure. Contrary to the observation of complete disappearance of reticulocytes following an acute exposure, in chronic exposure the number of circulating reticulocytes remains comparable to that of control animals. A rapid increase in numbers, however, sets in after termination of the exposure. This is analogous to the response of human macrocytic pernicious anemia to specific therapy. Clotting time remaines unchanged for the duration of the experiment, indicating that no excessive tendency to bleeding is likely the cause of death. Although gross and microscopic examination usually shows patchy ecchymoses of lungs, heart, stomach and particularly the small intestine, ecchymoses are not sufficiently severe to seem to have caused death of the animals.

The picture of the circulating blood is approximately the same in group II as in group I during the first 9 weeks after termination of the exposure. After that time the recovery processes proceed in group II and the number of all blood elements increases. Figures 7 and 8 show the increase of the number of erythrocytes and leukocytes. The number of platelets also increases. In a few animals this increase approaches normal but, on an average, amounts to approximately one-half normal. This continues for several weeks. Beginning at approximately the 12th week and continuing to the 24th week one animal after another develops a recurrent pancytopenia and dies. With the exception of the last animal, the terminal counts are not included in the figures to avoid large and confusing fluctuation of the curves. The picture of the pancytopenia is, however, the same for each individual animal as shown in the end of the curves which represent the data of the last animal. Contrary to the blood picture of group It he terminal leukocyte count shows a severe leukopenia with a relative lymphocytosis and an almost zero heterophil count. Figure 9 gives the cell diameters and stippling values. The increase in cell diameter (macrocytosis) following termination of the exposure is pronounced and persistent. Values for stipplings return to normal approximately after 10 weeks. There is a persistent increase in the number of circulating reticulocytes. Hemorrhage appears also to play no important rôle in group II since the crude clotting time determinations gave normal values ad gross or microscopic evidence of hemorrhage was small or absent.

In the third group in which complete recovery takes place, the initial phase of the blood picture is also identical with that of group I and II, and recovery of the anemia does not start until approximately 6 weeks after the termination of the exposure (Figs. 10 and 11). A rapid increase of all elements during the subsequent 6 weeks is followed by a gradual approach to normal which is most rapid in the heterophils and most delayed in the platelets. However, full recovery is a prolonged process and is not accomplished until after many months have passed. It is of interest to note that while the increased red cell diameter (macrocytosis) persists for about 60 weeks, reticulocytes and stipplings return to normal after approximately 10 weeks (Fig. 12).

Although the 10 animals of group III recovered

Fig. 4. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on red cell count of guinea pigs of group I.

Fig. 5. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on the leukocyte count of guinea pigs of group I.

Fig. 6. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on hematocrit, diameter and stippling of red cells of guinea pigs of group I.

Fig. 7. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on the red cell count of guinea pigs of group II.

INBRED GUINEA PIGS

(FAMILY 2)

CONTROL

8.8 r / 8 HRS. / DAY

REMOVED FROM FIELD

LEUCOCYTES (10² CELLS/CU. MM.)

WEEKS

Fig. 8. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on the leukocyte count of guinea pigs of group II.

HEMATOCRIT (PERCENT)

HALOMETER (MICRONS)

STIPPLING (PERCENT)

INBRED GUINEA PIGS

(FAMILY 2)

REMOVED FROM FIELD

REMOVED FROM FIELD

REMOVED FROM FIELD

CONTROL

8.8 r / 8 HRS. / DAY

WEEKS

Fig. 9. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on hematocrit, diameter and stippling of red cells guinea of pigs of group II.

Fig. 10. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on red cell count of guinea pigs of group III.

Fig. 11. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on leukocyte count of guinea pigs of group III.

from the pancytopenia, nevertheless their mean survival time was approximately 40 percent shorter than that of non-irradiated controls. Mean survival time of hybrid guinea pigs exposed under identical conditions to a limited exposure of 540 *r* was aproximately 30 percent shorter than that of non-irradiated controls. Adverse effects on their blood picture were moderate during the exposure and full recovery occurred shortly after the termination of the exposure. None of these animals died during the treatment. Although the number of experimental animals was too small to place great significance to the percentage given, nevertheless they seem to indicate not only that long term irradiation injury is independent of previous damage to the blood forming organs, but also that survivors of a large group of animals, the majority of which died early of pancytopenia, do not necessarily form a selected group as far as long term irradiation injury is concerned. This seems to be also true of survivors of acute exposures in the LD 50-30 day range. However, these experiments have not progressed far enough to reach a final conclusion. It is interesting to note that in the survivors of acute exposures no recurrent anemia has been observed so far, although the effect of the irradiation on the picture of the circulating blood was more severe than in the chronically exposed animals.

Preliminary histologic observations of the bone marrow reveal the following picture (*) : It is recalled that group I contained all those animals which died within 9 weeks following termination of the exposure. Some of these animals died within 4 to 5 days. The degree of cellularity of their bone marrow was slightly to considerably decreased while the different cellular components were in aproximately normal proportions (Fig. 13). In the remaining animals which lived several weeks after the termination of the

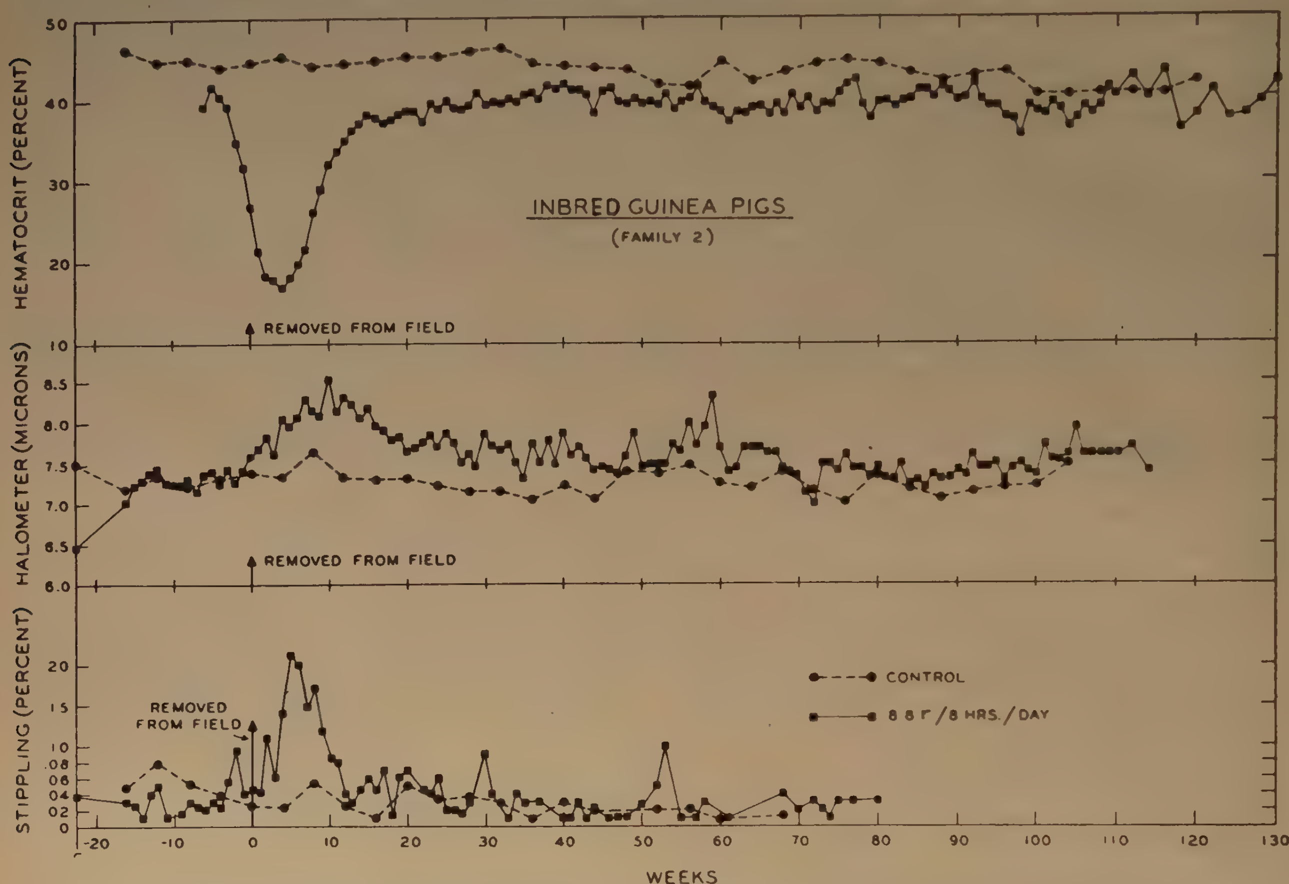


Fig. 12. — Effect of limited chronic gamma irradiation of 8.8 *r* daily (8 hours) on hematocrit, diameter and stippling of red cells of guinea pigs of group III.

(*) A. B. Eschenbrenner, National Cancer Institute unpublished data.

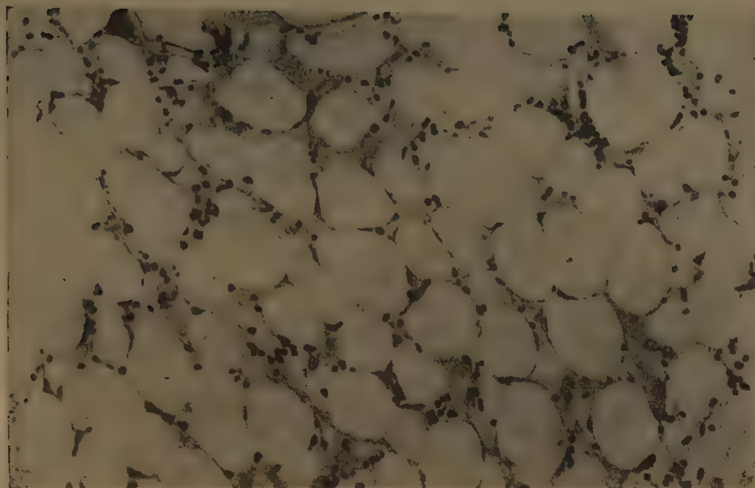


Fig. 13. — Bone marrow of guinea pig which died several days after termination of the exposure. Note acellularity. 200 X.

Terminal blood counts : erythrocytes, 1.2 million, leukocytes, 1600 ; platelets 10,000.

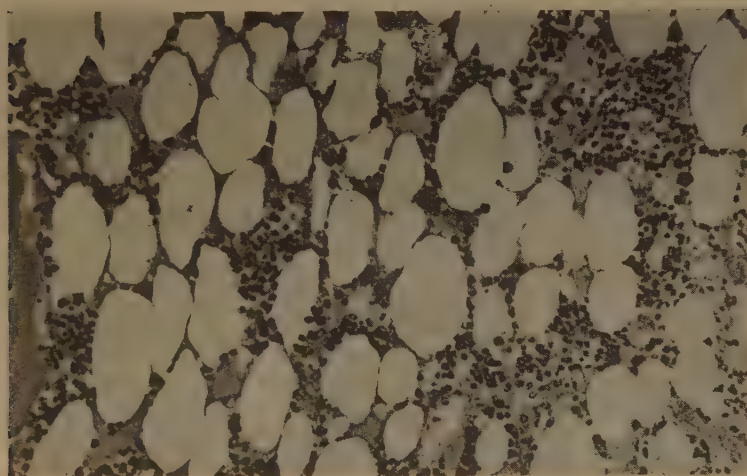


Fig. 14. — Bone marrow of guinea pig which died a number of weeks after termination of the exposure. Note the increased cellularity in comparison to Fig. 13. There is, however, a significant decrease in megakaryocytes. 220 X.

Terminal blood counts : erythrocytes 2.1 million ; leukocytes 4,000 ; platelets, 23,000.



Fig. 15. — Bone marrow of guinea pig which died several months after termination of exposure. Note apparent hyperactivity of bone marrow as shown by densily packed cells. Megakaryocytes are conspicuously absent. 200 x.

Terminal blood counts. erythrocyte, 1.1 million ; leukocytes, 1,100 ; platelets, 26,000 (5 days prior to death).

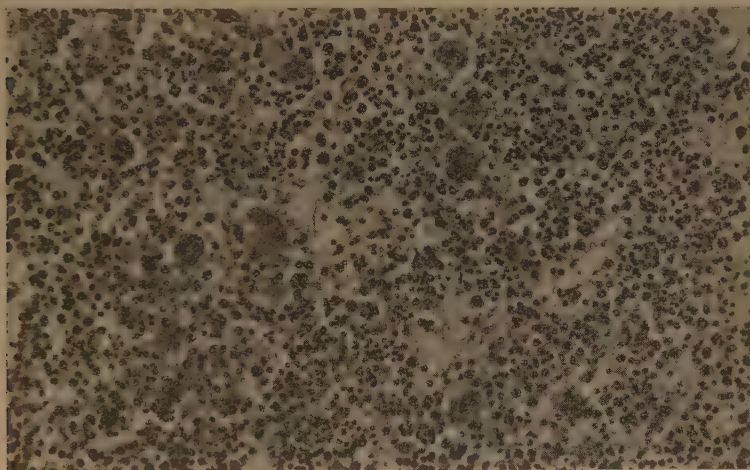


Fig. 16. — Bone marrow of guinea pig which apparently recovered fully from initial pancytopenia. Besides the degree of cellularity note especially the presence of approximately normal numbers of megakaryocytes. 200 x.

Blood counts (5 days prior to death) : erythrocytes, 4.1 million ; leukocytes, 4,900 ; platelets, 210,000.

exposure, the degree of cellularity of the bone marrow was normal or nearly approached normal but the proportion of the various cellular components was not normal. Conspicuous in these was a near absence of megakaryocytes (Fig. 14).

In group II in which abortive recovery took place and which is the most interesting group, the bone marrow of those animals which survived several months after termination of the exposure presented a striking picture. The marrow cavity was densely packed with cells to the exclusion of the usual fat vacuoles with striking absence or near absence of megakaryocytes (Fig. 15). In one animal of this group which succumbed to the recurrent anemia 168 days after termination of the exposure the degree of cellularity of the bone marrow was within normal limits. While megakaryocytes could be found with relative ease they were fewer in number as compared with the numbers existing in normal bone marrow. It is assumed that this animal nearly accomplished recovery yet finally died with a recurrent pancytopenia.

In group III the bone marrow was comparable to that of non-irradiated controls (Fig. 16).

The findings in group I and II are in striking contrast to observations found in the bone marrow of guinea pigs dying of pancytopenia following an acute exposure in the LD 50-30 day range. Here the bone marrow is atrophic, characterized by an almost complete absence of hematopoietic cells. This is in agreement with the finding in other species exposed acutely in the lethal range.

The effects of acute and chronic exposures at the dose rate of 8.8 *r* daily (8 hours) on the spleen and other lymphoid structures, on the other hand, are comparable. The injury is characterized by the finding of lymphoid nodules smaller in size and fewer in number than in non-irradiated guinea pigs. However, in guinea pigs chronically exposed to 8.8 *r* daily (8 hours) until death frequently areas of extramedullary hematopoiesis are seen in the spleen which are not observed in acutely exposed animals. In the guinea pigs of group I and II such areas are also found but less frequently.

In spite of the fact that a recurrent pancytopenia occurred in group II, histologic studies showed an intense hyperplasia of the hematopoietic tissues, yet these tissues were unable to contribute adequate numbers of mature red cells into the general circulation. Perhaps recent experiments of Jacobson (3-6) may give an explanation. He found that a spleen surgically mobilized and shielded by lead during an acute exposure effectively protected mice exposed to doses of X-irradiation (≤ 1000 *r*) which would kill the majority of mice without spleen protection. Moreover, the mice, the spleen of which was shielded developed no anemia and only a transient leukopenia and thrombocytopenia, and in addition rapid recovery of the bone marrow in comparison to mice without spleen protection was found. Jacobson also reported (7) that intra-abdominal implantation of several spleens of young mice (4-5 days old) into mice following total body irradiation without spleen protection indicated that hematopoietic regeneration in these mice was more rapid than in mice irradiated under identical conditions without spleen implants. He suggests that a humeral mechanism originating with shielded spleens may be responsible for the stimulation and recovery of the irradiated hemotopoietic tissue. In the case of the chronically exposed guinea pigs of group II dying of pancytopenia in spite of an intense hyperplasia of the hematopoietic tissue, Jacobson commented as follows : « One might postulate that the factor involved in stimulating or maintaining normal hemotapoiesis is incomplete and thus maturation and delivery of cells is not accomplished. Chronic exposures under these conditions may produce a state comparable to the panhypersplenism described in the human. This could account for the rapid decrease in the red cells by hemolysis as well as reduction in other cellular elements. » It has not been possible yet, however, to demonstrate a hemolytic factor ».

While the onset of the anemia in acutely as well as chronically exposed guinea pigs is similar, recovery in acutely exposed animals is rapid and complete within a few weeks. On the other hand recovery following chronic irradiation is a slow process lasting for many months. It is possible that a reduction in the availability of the hypothetical humoral factor, discussed above, persists for a long time thus delaying recovery. However, and perhaps more likely, as the mean accumulated dose in chronic exposure must be approximately 3 times the acute dose to produce similar effects on the constituents of the circulating blood, it seems that different radiosensitivities of the blood forming organs may be responsable, i. e. that the cumulative factor in chronic irradiation is different for different blood forming organs and results in a more severe damage to one or the other blood forming organs thus slowing down recovery of the whole system. It is obvious that differences in radiosensitivity will be more pronounced in animals subjected to the higher total

accumulated dose of chronic exposure than in animals irradiated with an acute dose.

RÉFÉRENCES

(1) Lorenz, E., Heston, W. E., Jacobson, L. O., Eschenbrenner, A. B., Shimkin, M. B., Deringer, M. K, Doniger, J. and Schweisthal, R. — Effects of long continued total body gamma irradiation on mice, guinea pigs and rabbits, Part I-VI, NNE. S. Div. IV, Vol. 2213 in preparation.

(2) Jacobson, L. O., Marks, E. K. and Lorenz E. - The hematological effects of ionizing radiations. *Radiology*, **52**, 371 to 395, 1950.

(3) Jacobson, L. O., Marks, E. K., Gaston, E. O., Robson, M., and Zirkle, R. E. — The Role of the spleen in radiation injury. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **70**, 740-742, 1949.

(4) Jacobson, L. O., Marks, E. K., Robson, M. J. Gaston E., and Zirkle, R. E. — The effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J. Lab. and Clin. Med.*, **34**, 1538-1543, 1949.

(5) Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Bethard, W. F., Marks, E. K., and Robson, M. J. — The influence of the spleen on hematopoietic recovery after irradiation injury. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **73**, 455-459, 1950.

(6) Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Marks, E. K., Robson, M. J., Bethard, W. F., and Gaston, E. O. — The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J. Lab. and Clin. Med.*, **35**, 746-770, 1950.

(7) Jacobson, L. O., Simmons, E. L., Marks, E. K., Robson, M. J., Gaston, E. O., and Bethard, W. F. — Progress Report : Spleen shielding experiments. Quaterly report, *Biol. and Med. Div.*, Argonne National Laboratory, Feb., March and April, 1950, ed. A. M. Brues, ANL-4451 (unclassified), p. 25.

THE APPLICATION OF RADIOCARBON IN THE STUDY OF RADIOLESIONS

by Professor G. HEVESY (Stockholm)

The most spectacular effect observed shortly after irradiation may be mitotic arrest. The explanation suggest itself that such arrest is not due alone to an interference with molecular rearrangement during the mitotic process, but to an interference with the synthetic processes of cellular constituents which wholly or partly takes place during interphase. The fact that irradiation interfers with the formation of desoxyribo-nucleic acid was shown by earlier experiments in which the rate of incorporation of ^{32}P into desoxyribo-nucleic acid of irradiated sarcoma or growing normal organs was compared with the rate of incorporation of ^{32}P into corresponding fractions of non-irradiated controls. Experiments in which the rate of incorporation of ^{14}C into purines of desoxyribo-nucleic acid of irradiated organs of newly born rats and into corresponding fractions of controls was compared, led to similar results. Irradiation with 880 r reduced the rate of incorporation of ^{14}C by 20 to 70 per cent. In these experiments acetate labelled in the carboxyl group was administered by subcutaneous injection and the rats were killed 4 to 7 hours later. The average percentage inhibition observed in some of these experiments is seen in Table 1.

TABLE 1. — *Percentage inhibition by a X-Ray Dose of 880 r of the Incorporation of ^{14}C into Purines of Desoxyribo-Nucleic Acid Prepared from the Liver of Suckling Rats.*

Mean value obtained for 55 animals.

Fraction	Percentage Change in the Incorporation of ^{14}C due to the Effect of Irradiation
Purines	— 44
Proteins	+ 27

The inhibition of ^{13}C incorporation is not confined to purines of desoxyribo-nucleic acid. A similar inhibition was observed in the purines of ribose-nucleic acid and the rate of formation of some other molecular constituents may be retarded as well.

Retardation of the formation of any intermediary product of nucleic acid formation into which labelled carbon is incorporated will lead to a partial inhibition of the formation of labelled nucleic acid. But even interference with the formation of a metabolic product, not involved in nucleic acid formation may lead to a marked change in the ^{14}C content of the nucleic acid. Such a metabolic interference may namely lead to a change in the sensitivity of the radioactive indicator which then produces a corresponding change in the ^{14}C content of the nucleic acid formed, though not in the amount of ^{12}C turned over. Instead of nucleic acids we may consider any other tissue constituent without invaliditating the last mentioned statement.

The change in sensitivity of the radioactive indicator with time is very conspicuous in the case of rapidly metabolising precursors such as acetate. From the work of Bloch and Rittenberg we know that a 100 g rat produces 1 g acetate per day. That, in spite of these very appreciable amounts of acetate formed, the acetate concentration of the body fluids of the rat is low is due to the rapid incorporation of acetate with various tissue fractions.

Injected labelled acetate will soon be distributed and diluted by endogenous (non, or — in the later phases of the experiment — slightly active) acetate. While labelled acetate is metabolized without being replaced, endogenous acetate is constantly newly formed. The result of these processes is an increasing dilution of the active acetate molecules by non-active ones with time and, correspondingly a decrease in the specific activity of acetate of the body fluids with time. While, in an early phase of the experiment 1000 counts have indicated the presence of a micromol of acetate they may indicate in a later phase the presence of 10 times as much.

If, due to irradiation or another metabolic interference, fat catabolism or any other process leading to endogenous acetate formation were slowed down. the active acetate would become less dilute than in the absence of such an interference and, correspondingly, the formation of labelled fatty acids would

take place in a more active medium. Under physiological conditions the rate of formation and the rate of catabolism is about the same. Metabolic interference may upset this compensation.

In the mouse liver fatty acids are metabolized at such a remarkable rate that the specific activity of fatty acid carbon is decreasing after the lapse of about 20 minutes. This decrease is due to the replacement of active fatty acid molecules formed in an early phase of the experiment by such formed later from less active acetate. If the dilution of radioactive acetate by endogenous inactive acetate is slowed down the decrease of the fatty acid activity with time will take place at a slower rate, and vice versa. Thus, an increased ^{14}C content of the liver fatty acids observed, for exemple, after the lapse of 1 hour after injection of labelled acetate may indicate a metabolic arrest or, more correctly, it may indicate that irradiation influences to a minor degree the rate of incorporation of ^{14}C into fatty acids than the extent of dilution of the radioactive precursor by the endogenous non-radioactive one.

Similar considerations apply to other metabolic products of acetic acid. If the metabolic interference is retarding catabolic $^{12}CO_2$ production at a more marked rate than acetate metabolism leading to $^{14}CO_2$ formation, the $^{14}CO_2$ of the body fluids will be diluted by $^{12}CO_2$ to a minor extent than it is under physiological conditions. The activity level of CO_2 being higher in the above mentioned organism ^{14}C incorporation into glycogen, for example, will be found to be increased. An inhibition, produced by irradiation, of 20 to 70 per cent of the ^{14}C incorporation into nucleic acid purines of the liver mentioned earlier thus does not necessarily indicate a corresponding inhibition of nucleic acid formation. In suckling rats we found the ^{13}C content of the liver proteins of irradiated rats to be increased with 27 per cent. If the specific activity of the purine precursors is increased to the same extent as is the specific activity of proteins, a 20 to 70 per cent inhibition of ^{13}C incorporation into purines corresponds to a 27 to 96 per cent inhibition of desoxyribo-nucleic acid formation. While, due to the lack of knowledge of the change in the indicator sensitivity of purine precursors, we cannot obtain exact inhibition figures, the data obtained clearly indicate a marked inhibition of nucleic acid formation in the organs of the irradiated mice.

The increased uptake of ^{14}C by the proteins of the liver, respectively the brain, seen in Figures 1 and 2 — each point of the figures indicating a value

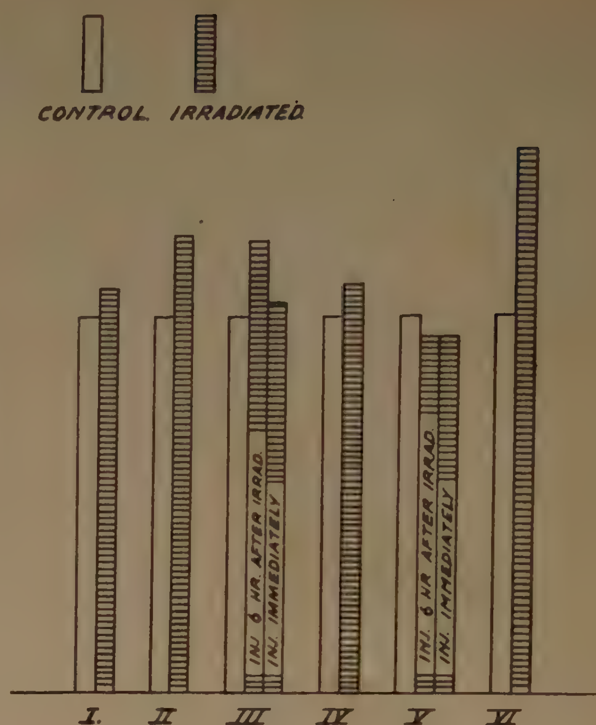


Fig. 1. — Effect of Irradiation with 880 r on the Incorporation of ^{14}C into Liver Proteins.

I. Injected immediately after irradiation with acetate, killed 7 hr, later.
II. Injected immediately, killed 24 hr, later.
III. Injected 6 hr, after irradiation, killed 1.5 hr, later. Injected immediately, killed 1.5 h r, later.
IV. Injected 24 hr, after irradiation, killed 1.5 hr, later.
V. Injected 6 hr, after irradiation, killed 1.5 hr, later. Injected immediately, killed 1.5 hr, later.
VI. Injected 24.5 hr, after irradiation, killed 1.5 hr, later

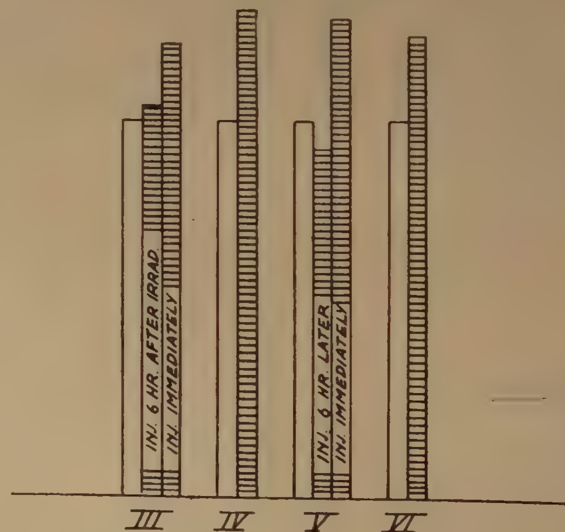


Fig. 2. — Effect of Irradiation with 880 r on the Incorporation of ^{14}C into the Proteins of the Brain.

obtained for 10 pooled organs of 9 to 27 g fed mice — are possibly due to an increase in the sensitivity of the ^{14}C indicator in the irradiated mouse, though the possibility cannot be excluded that an increase in the ^{14}C content of proteins is due to an increased rate of turnover.

It should be possible to distinguish between the above mentioned alternatives by investigating the effect of irradiations on ^{14}C incorporation both in experiments taking a few minutes only and in experiments taking more than 15 min. An increased turnover rate can be expected to lead to an increased ^{14}C incorporation in both cases. The change in the sensititivy of the ^{14}C indicator due to an abnormal dilution of the labelled acetate or its transformation products by an endogenous counterpart acts, however, in an opposite sense in the earliest stage and the later part of the experiment.

If, for example, irradiation would not influence the rate of acetate metabolism but would inhibit glycogen formation in the liver, the ^{14}C content of glycogen should be depressed both in experiments taking a few minutes and in such taking many hours.

Should irradiation inhibit acetate metabolism the activity of the CO_2 produced would be in experiments taking a few minutes lower in the irradiated mouse than in the control, while in experiments taking more than 15 min. the opposite would be the case. As following administration of acetate labelled in the carboxyl group most ^{14}C enters the glycogen molecule by fixation of CO_2, in experiments taking a few

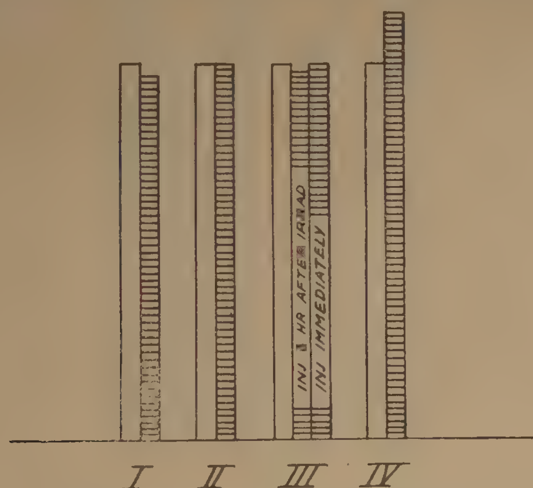


Fig. 3. — Effect of Irradiation with 880 r on the Incorporation of ^{14}C into the Proteins of the Kidneys.

minutes only the glycogen of the irradiated mouse should contain less ^{14}C than that of controls, while in experiments taking more than 15 min. the opposite should be the case.

As seen in Figure 3 irradiation did not influence significantly the incorporation of ^{14}C into kidney proteins. The mean value of the ^{14}C content of the intestinal mucosa proteins of the irradiated and non-irradiated mice did not differ significanthy in these experiments. Plasma proteins show, however, a significantly higher ^{14}C content in the irradiated mice than in the controls. Figure 4 demonstrates the ^{14}C of the dry plasma, which was largely found to be due to its protein content.

In contrast to the effect of irradiation on the incorporation of ^{14}C of the proteins of the liver, irradiation was found not to increase the ^{14}C content of liver fats significantly. As seen in Figure 5 and 6 the brain fat fractions and also the dry brain tissue took up more ^{14}C than did the corresponding fractions of the controls.

As demonstrated Table 2 the amount of ^{14}C incorporated into various tissue fractions is far from being negligible.

TABLE 2.

Organ	Percentage of injected ^{14}C present after the lapse of 1.5 hr, in 1 mg		
	dry tissue	total fat carbon	protein carbon
Liver	7.5×10^{-3}	54.1×10^{-3}	4.1×10^{-3}
Intestinal mucosa	9.8×10^{-3}	39.4×10^{-3}	16.8×10^{-3}
Lungs	2.8×10^{-3}	15.7×10^{-3}	1.8×10^{-3}
Muscles	1.0×10^{-3}	4.7×10^{-3}	0.61×10^{-3}
Brain	0.91×10^{-3}	2.9×10^{-3}	0.48×10^{-3}

In a mouse liver of 300 mg dry weight 2.2 per cent of the ^{14}C injected are thus present after the lapse of 1.5 hr, while more than three times as much were found 20 minutes after injection. The fatty acid and cholesterol fractions are to a large extent responsible for the high ^{14}C content of the liver and tissue. Among the proteins those of the intestinal mucosa are by far the most active ones.

The higher ^{14}C figures of 1 mg dry plasma in the irradiated mouse seen in Figure 4 are, as already mentioned, due mainly to a higher activity of plasma proteins resulting at least partly from the higher protein activity level in the liver, the site of formation of much of the plasma proteins. We witness here an example of indirect radiation effect. Irradiation of the liver may lead to a change in the protein con-

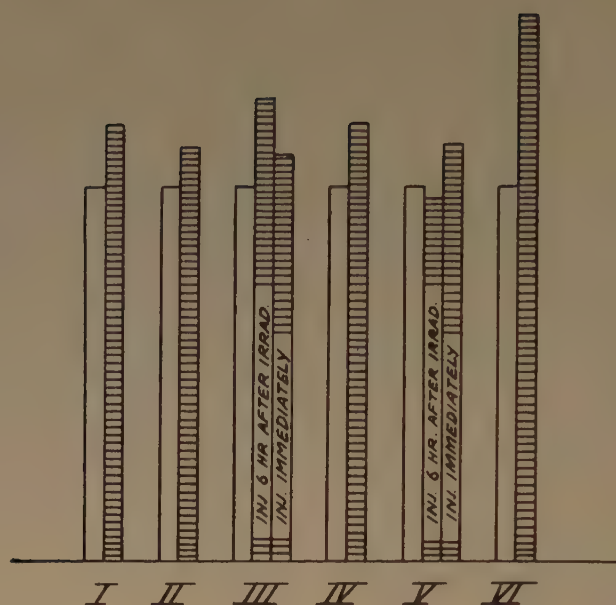


Fig. 4. — Effect of Irradiation with 880 r on the Incorporation of ^{14}C into Dry Plasma.

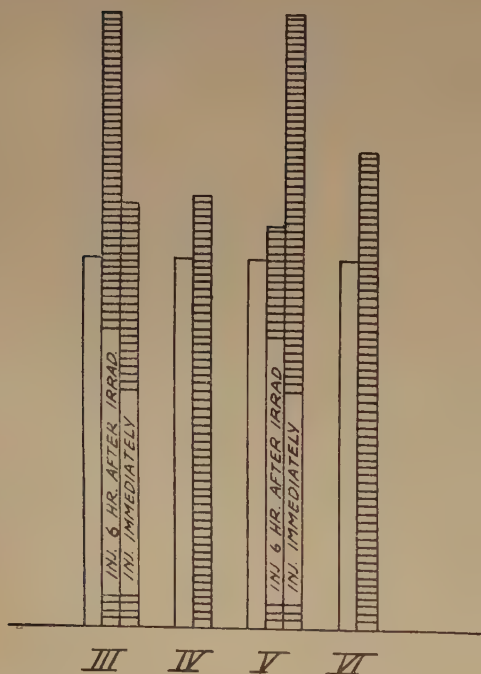


Fig. 5. — Effect of Irradiation with 880 r on the Incorporation of ^{14}C into Dry Brain Tissue.

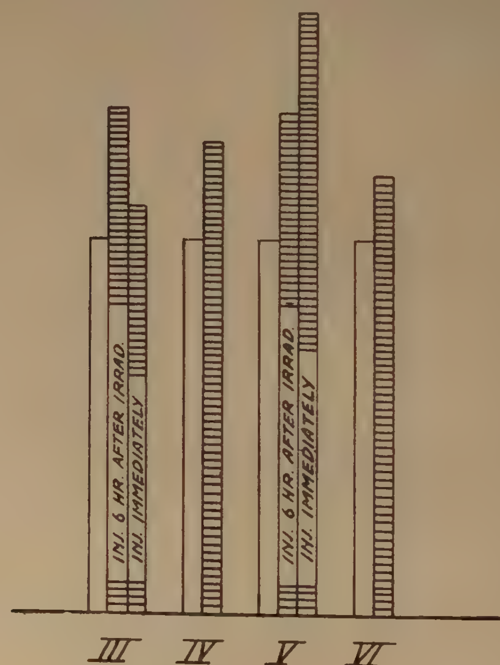


Fig. 6. — Effect of Irradiation with 880 r on the Incorporation of ^{14}C into Brain Fats.

tent of the plasma or also to changes in the sensitivity then of ^{14}C as an indicator of liver proteins, which then reflects it self in a corresponding change in the ^{14}C content of the plasma proteins and their catabolic products. The same conclusion applies to plasma phosphatides which to a large extent originate from the liver as well.

Several years ago it was observed that the irradiation of a sarcoma may influence the ^{32}P content of the desoxyribo-nucleic acid of an other unshielded sarcoma in the same rat as well and recently Harden Jones found that irradiation of the liver may influence the incorporation of ^{32}P into muscle nucleic acids and *vice versa*.

The application of ^{14}C reveales besides the above mentioned examples numerous other cases of indirect radiation effects. Interference with the formation of acetoacetonate in the liver will reflect itself in the metabolic processus taking place in the muscles, as most of the acetonacetate of the muscles is presumably synthesized in the liver. A change in the ^{14}C content of the liver acetoacetonate will furthermore lead to a change in the ^{14}C content of muscle aeetoacetonate and its transformation products.

The results described above were obtained with fed animals. In an investigation which aimed at the elucidation of the way of protecting the action of cysteine, carried out in collaboration with Dr. Forssberg, in which fasting mice were investigated, we obtained results which in some points differ from those mentioned above.

We have to conclude from this and other findings that some of the effect of irradiation on ^{14}C incorporation into tissue fractions in fed animals is due to interference of irradiation with absorption from the intestine and possibly also that the irradiated animals do not take up the same amount of food as do the controls. It is known from Barron's work that 2-4 hours after irradiation with 200 r a significant (12 per cent) inhibition of glucose permeability by the intestine takes place. Altman and assoc., studying the resorption in the α-carbon labelled glycine from the intestinal tract of the rat, found that absorption is reduced under the effect of 300 r or more.

Without underrating the great difficulties which the interpretation of the results obtained offers the study of the effect of irradiation on the rate of incorporation of ^{14}C into molecular tissue constituents seems to offer a hopeful line of attack of elucidating biochemical changes produced by ionizing radiation.

PROTECTION OF BIOLOGICAL SYSTEMS FROM THE EFFECTS OF IONIZING RADIATION (*)

LESLIE F. NIMS
Biology Department Brookhaven National Laboratory
Upton L. I. N. Y.; U. S. A.

SUMMARY

It is impossible to protect biological systems from the physical effects of ionizing radiation. Protection can be achieved against some of the chemical oxidations resulting from radiation but the protecting substances must be present during the exposure for the major protective effect. Further studies on the biological mechanisms damaged by radiation give some hope of developing a rational therapy for the radiation syndrome.

Soon after the discovery of X-rays and the naturally occuring radioactive elements, it was almost immediately recognized that biological systems are exquisitely sensitive to the actions of ionizing radiation. During the last fifty years many investigators have studied the diverse consequences of the exposure of simple chemical systems, constituents of living systems, cells, tissues and whole organisms to ionizing radiation and a large body of knowledge, mainly descriptive, has arisen concerning these effects. Yet when one considers the lethal effects of whole body radiation upon mammals, one is at a loss to account for the fact that a dose of 1000 *r* or less leads to changes resulting in the death of the animals in two weeks or so, particularly when one remembers that for a dose of 1000 *r* only a few molecules out of a population of 10^8 are affected by the initial physical processes of energy transference. This implies, of course, the existance of critical biochemical systems in the cells and a major problem of radiobiology is the identification of the initial steps in those systems which from radiological data appear to be composed of entities present in small concentration, but which are so important to the economy of the cell and to the assemblage of cells which comprise the whole organism.

Physical Aspects. — The absorption of energy by a living system from an incident flux of radiation results ultimately in the production of activated atoms and ionized atoms.



$$Rad + NA \rightarrow XA^* + yA^+ + ye^- + (Rad).$$

These atoms generally constitute parts of molecules of biological importance and the subsequent chemical history is largely the result of the increased reactivity of these high energy molecules. In the complex solutions which comprise the greater part of living systems, the proportion of ionized versus activated atoms is not known to any degree of certainty. The initial ionization and activation is quite small in comparison to the secondary ionization, and in most instances it may be said that the major portion of the biological effect is due to emitted electrons for these have sufficient energy to carry on many similar reaction steps before they are finally captured. To a first approximation the total number of energized molecules of a given species must be proportional to absolute concentration of these molecules in the living system. Since water molecules are the major component of such systems, it seems evident that much of the biological effectiveness of radiation must be the result of the products arising from the irradiation of water. The important thing to the biologist interested in protection is that there is no way of protecting the biological system from these initial physical processes whether the atoms energized lie in the gene or in some of the less critical constituents of the living cell. Even if all of the subsequent secondary chemical reactions could be prevented, a biological effect should still be evident due to physical destruction of the normal materials.

Chemical Aspects. — As stated above, the radiation chemistry of solutions is important to the understanding of possibilities of protection. If it be a water molecule that is ionized



$$H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^-$$

a whole series of chemical reactions at once become

(*) Research carried out at Brookhaven National Laboratory under the auspices of the U. S. Atomic Energy Commission.

possible. Ionized water can react with norml water to produce new ions and a hydroxyl radical



$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH.$$

The electron can react with waterto give free hydrogen $H_2O + e^- \rightarrow OH^- + H$ as is well known in ordinary electrolysis. Also, the hydroxyl radical can combine to form peroxide $OH + OH \rightarrow H_2O_2$ and the amount of peroxide exists in greater concentration in the tracks of densely ionizing radiation. The point of interest to the biologist is that the result of irradiation of solutions is the production of milieux containing substances of intense oxidative and reductive power and the experimental facts seem to indicate that organic compounds of biological interest are largely oxidized as a consequence of irradiation. On this basis it is possible to partially protect a living system from the consequences of irradiation because any easily oxidizable substance of which neither it nor its oxidation products are too toxic to the cell would compete for the free radicals present and tend to preserve important chemical constituents of cell from further attack. In solutions of enzymes these protection effects have been amply demonstrated by the work of Dale and Barron among others, and this may be the explanation of the remarkably protective effect achieved by Patt who finds that large doses of cysteine injected prior to exposure protects rats against lethal doses of X-radiation.

It must remembered that while a large part of the free radicals formed in the irradiation of living systems are due to reactions of water, other materials in the living system can also be activated and compounds such as organic peroxides may play some role. It is difficult to treat quantitatively these chemical aspects of the radiation effects because of the complexity of systems under consideration, but the total effect must be due to the integrated sum of all the possible reactions including both forward, backward and competitive reactions. It seems quite evident that the protective substance used must be present during the irradiation, for the half-life of the majority of the free radicals is, for the most part, a fraction of a microsecond and the possibility of competitive reactions absorbing the oxidative energy before the full extent of damage is done to the constituents of the biological system is equally short.

Since most biological systems contain appreciable amounts of oxygen the possibility of the formation of the HO_2 radical from atomic hydrogen and molecular oxygen exists — $H + O_2 \rightarrow HO_2$. The biological system seems to be particularly sensitive to this « superoxide » and the remarkable effect of anoxia in protecting cells from mutations and from chromosome breaks, and in protecting rats and mice from the lethal effects of X-rays, is explainable in part. The amount of HO_2 produced in an irradiated aqueous system should be proportional to the oxygen pressure. Lowered oxygen pressure decreases the concentration of the HO_2 and thus those effects due to oxidations by HO_2 molecules should be decreased.

Biological aspects. — The practical problem of the protection of the higher forms of life against the effects of ionizing radiation thus resolves itself largely into the application of suitable therapeutic measures after the damage has been done. The well recognized loss of resistance of irradiated animals to auto- and external infection can be treated with antibiotics and massive repeated transfusions are indicated for the anemias that develop. The care of patients at present is largely treatment of symptoms. Better forms of therapy await a more adequate understanding of the biological mechanism underlying radiation injury at both the cellular level and at the whole animal level.

At the Brookhaven National Laboratory work on the fundamental aspects of radiation injury is now underway. A factor of some importance to the protection problem is illustrated by the investigations of Dr. Arnold H. Sparrow on the pollen mother cells of the plant *Trillium erectum*. He finds that sensitivity of the chromosomes of these cells during meiosis exhibits changes in sensitivity of over a hundred fold as judged by the chromosome abnormality resulting from exposure. A search is being made for the biochemical concomitants of this remarkable fluctuation in sensitivity. Preliminary data obtained by Dr. M. J. Moses of our laboratory indicate that sensitivity is high when the rate of nucleic acid synthesis is low or decreasing.

Studies on individual cells demonstrate that the effects on the nuclear materials occur at dosage levels low enough to account for the sensitivity of the more organized forms of life to ionizing radiation. Much more work is needed on the disturbances of the mechanisms of cellular divisions and the means of aiding the reparative process in damaged cells. The knowledge gained by a study of changing radiosensitivity exhibited by developing cells may lead to much better protective materials and procedures.

The problems are much more complex in the higher forms of life, for here the specialized organ systems exhibit widely varying degrees of radiosen-

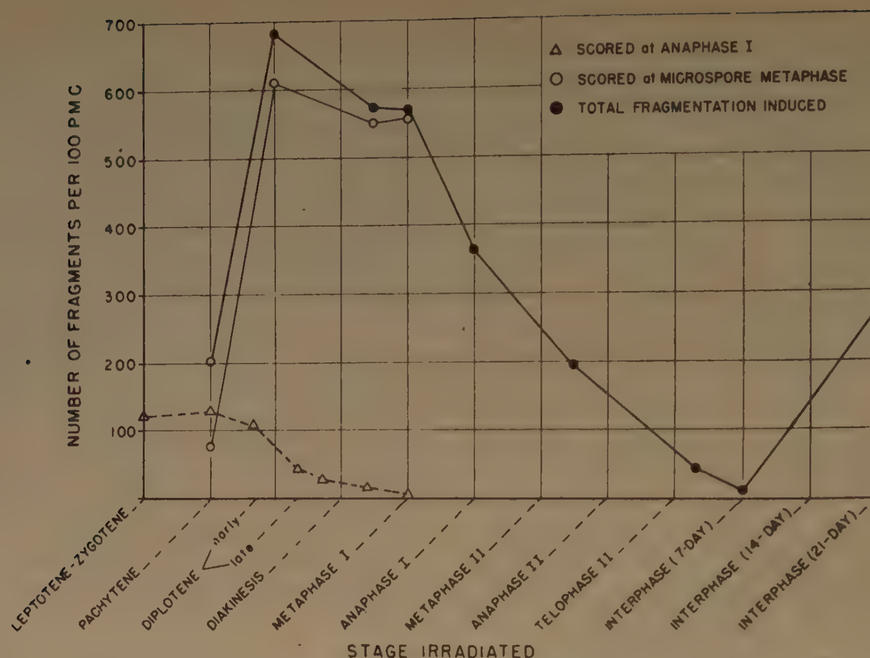


Fig. 1. — Graph showing the numbers of chromosome fragments induced by an exposure of 50 *r* of X-rays at various stages of the nuclear cycle during microsporogenesis in *Trillium erectum*. The sensitivity is greatest in the diplotene stage and appears to be some 100-fold larger than during the interphase (7-day) stage. — Illustration furnished by the courtesy of Dr. A. H. Sparrow and the New York Academy of Sciences and is from a publication « The Mechanisms of Cell Division » Annals of the New York Academy of Sciences Vol. 51 February 1951 (in press).

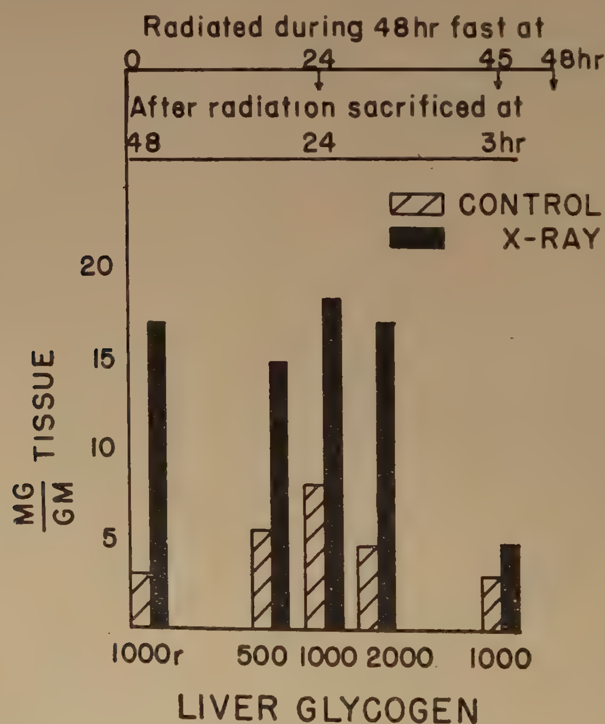


Fig. 2. — The increase in liver glycogen of irradiated fasted animals. This response of the fasted animals is similar to the liver glycogen changes seen in other stress situations (anoxia, cold, etc.). Presented at the Fifty-eighth Annual Meeting of the American Physiological Society. (N. North and L. F. Nims, Federation Proceedings **8**, 119 (1949).

sitivity. Experiements done in various laboratories, as well as those initiated by Dr. A. Edelmann and myself in our own laboratories, indicate that whole body irradiation initiates processes in the animals very similar to those seen in other stress situations. Much of the disturbance appears to be mediated through the pituitary adrenal system. For

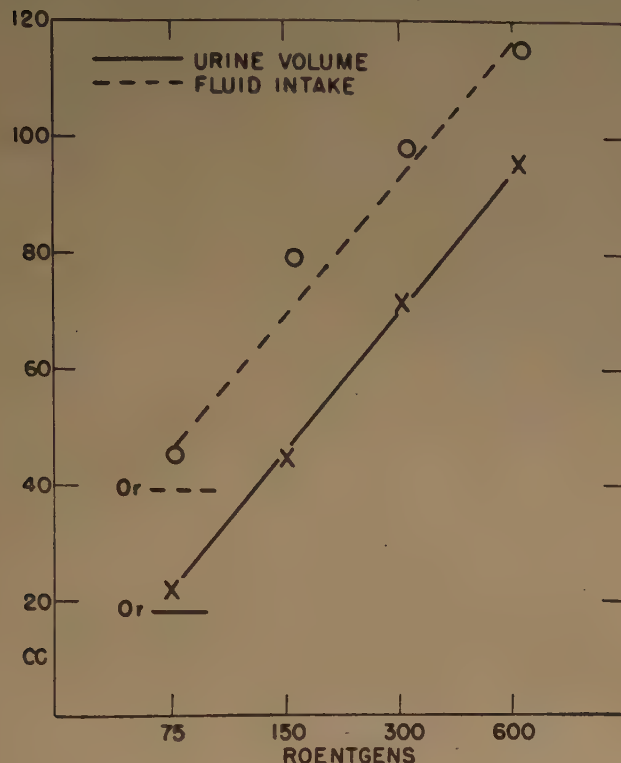


Fig. 3. — The water turnover in 200 gram rats during the first 24 hours following whole body exposure to X-rays. « Or » indicates zero radiation or control values. Presented at the Fifty-eighth Annual Meeting of the American Physiological Society. (A. Edelmann, Federation Proceedings **8**, 39 (1949)).

example, in fasted rats an increase in the liver glycogen is found in irradiated animals, a result which in large measure is due to stimulation of the pituitary gland. Similarly, Dr. W. E. Edelmann and Dr. W. J. Eversole have found that the increase in water turnover in experimental animals is apparently due to the relative loss of antidiuretic activity in the blood of the irradiated rats. This result is tentative since the experiments are still in progress. The general principle exemplified by this experiment is important for it appears that some of the radiation effects in whole animals are not only due to loss of cellular units but are also due to absolute decreases of important hormonal constituents as well.

Other experiments have been done in order to assay the role of the pituitary-adrenal system in the radiation syndrome. It has been found that adrenalectomized animals are much more sensitive to the lethal

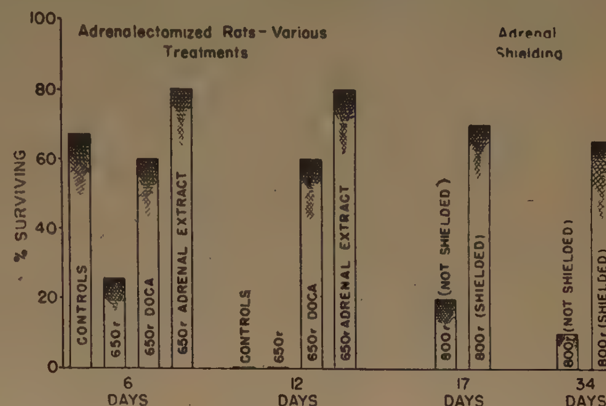


Fig. 4. — The survival rats after X-irradiation. Irradiated adrenalectomized rats die sooner than adrenalectomized untreated control rats. If the adrenalectomized rats are treated with either desoxycorticosterone or an extract of the adrenal gland, the survival of the irradiated animals is greatly increased. The survival of normal animals can be greatly increased if their adrenal glands are protected from the whole body radiation by lead shields placed around the glands. Presented at the Fifty-ninth Annual Meeting of the American Physiological Society. (A. Edelmann, Federation Proceedings **9**, 36 (1950)).

effects of radiation than normals, and these animals can be protected by the proper substitution therapy.

If the adrenal gland itself is affected by radiation and contributes to the lethality of exposure, then shielding of the gland should confer some measure of protection. Dr. Edelmann did this by placing lead shields around the glands and then exposing the animals to X-rays. The lead was thick enough to reduce the direct dose to theg land by some 95 % of total body dose. These animals, thus protected, had a much increased survival rate. Why this occurs is as yet unknown for in the unshielded animal very little evidence of damage to the adrenal gland is seen by histological techniques. But, the experiment does indicate that some of the biochemical processes of the adrenal gland are disturbed by X-irradiation and these processes are important for the survival of the animal.

Le Gérant : M. Chatelet.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher). France. — 20-6-1951.

Dépôt légal : 2e trimestre 1951.

COMPOSITION DU BUREAU ET DU CONSEIL
DE LA
SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE
POUR L'ANNÉE 1950-1951

Président .... M. M. ABRIBAT
Vice-Président .... M. A. DOGNON
Secrétaire Général .... M. G. EMSCHWILLER
Secrétaire Adjoint .... M. A. SAINT MAXEN
Trésorier .... M. M. CHATELET

MEMBRES DU CONSEIL

Mme DOBRY-DUCLAUX
MM. D. DERVICHIAN
G. KERSAINT
MM. R. ARDITTI
A. LANDUCCI
M. PRETTRE

ANCIENS PRÉSIDENTS

MM. G. DARZENS, L. LAPICQUE, M. DE BROGLIE, A. MAYER, C. MAUGUIN, J. DUCLAUX, E. DARMOIS, R. DUBRISAY, R. WURMSER, E. BAUER, M. DELÉPINE, F. JOLIOT, E. FAURÉ-FREMIET, P. JOLIBOIS, J. TRÉFOUËL, P. JOB, R. AUDUBERT.

ANCIENS PRÉSIDENTS DÉCÉDÉS

MM. J. PERRIN, G. URBAIN, P. LANGEVIN, A. HALLER, A. COTTON, V. HENRI, H. MOUTON, C. MOUREU, A. JOB, H. COPAUX.

Les réunions de la Société de Chimie Physique ont lieu les 2e et 4e mercredis de chaque mois, pendant la durée de l'année universitaire, à 17 heures, dans l'Amphithéâtre du Laboratoire de Chimie Physique de la Faculté des Sciences, 11, rue Pierre-Curie, Paris (5e). Les communications y sont toujours suivies de discussions. Il est fait appel pour des conférences à des Savants et Professeurs de province et de l'étranger.

La correspondance intéressant la Société doit être adressée au Secrétaire Général, G. EMSCHWILLER, École de Physique et de Chimie, 10, rue Vauquelin, Paris (5e).

SOCIÉTÉ DE CHIMIE PHYSIQUE

Reconnue d'Utilité Publique par Décret du 9 Août 1937

BULLETIN D'ADHÉSION

à renvoyer au Secrétaire Général, G. EMSCHWILLER
École supérieure de Physique et de Chimie, 10, rue Vauquelin, Paris-V^e^

Je demande mon admission au titre de Membre de la Société de Chimie Physique, avec / sans (1) abonnement au Journal de Chimie Physique.

Nom du Demandeur : ....

Prénom : ....

Titres ou Profession : ....

....

Adresse : ....

A ...., *le.* *19*

....

MM. ....

consentent à présenter ma candidature.

Signature du demandeur : ....

Signature des parrains : ....

....

(1) Rayer la mention inutile.